



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

**POLIMORFISMO DO GENE *GSTP1* EM UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
DE ASSOCIAÇÃO COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE
REUMATÓIDE EM SANTA CATARINA**

MAYARA DELAGNELO MEDEIROS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

**POLIMORFISMO DO GENE *GSTP1* EM UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E
DE ASSOCIAÇÃO COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE
REUMATÓIDE EM SANTA CATARINA**

MAYARA DELAGNELO MEDEIROS

Trabalho apresentado como requisito
para o cumprimento da disciplina Estágio
II (BIO5156) do currículo do Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: **Prof. Dra. Ilíada Rainha de Souza**
Co-orientadora: **Ms. Lia Kubelka de Carlos Back**

Florianópolis, novembro de 2009.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, principalmente meus pais, que sempre me apoiaram, me aconselharam nas decisões e não mediram esforços para proporcionar o melhor para mim ao longo desses cinco anos e também, de toda minha vida.

À Professora Ilíada, pelas orientações concedidas, por todos os ensinamentos conferidos e apoio ao longo desta curta, porém grandiosa jornada. À Lia que mesmo com situações adversas, se propôs a auxiliar nas análises e correções dos dados, sugestões e opiniões acerca do trabalho.

Aos membros da banca, Adriana Fontes Zimmermann e Paulo Roberto Petersen Hofmann, por terem aceitado participar da banca, analisar e avaliar este trabalho.

Aos “Lapogeanos”, por terem me recebido tão bem e criado um ambiente tão prazeroso de trabalho. Agradecimentos especiais às “TCCeandas” Luísa e Ticiane, pelas discussões, crises compartilhadas, companheirismo nas coletas, entre muitos outros.

Aos amigos. Agradecimento especial àqueles de “2005.1”, por todos os momentos de alegria vivenciados: aula da Verinha e seus “flagrantes”, viagem a Torres, “sessões descarrego” no fim do semestre, festas, peixadas, horas felizes, mostras de música, congressos, EREB, entre outros milhares de momentos inesquecíveis. Àqueles amigos fora do círculo acadêmico que tiveram que entender os momentos ausentes, em alguns casos a distância, mas que sempre se mostravam presentes em minha vida, de uma forma ou de outra. Agradeço às discussões, às risadas, às lágrimas enxugadas, proporcionadas por esses amigos, fundamentais em minha vida.

Aos mestres, que contribuíram imensamente não só com a minha formação, mas também com meu caráter, minhas ideologias e paixão pela biologia.

Aos participantes que aceitaram colaborar com esta pesquisa e ao Dr. Ivânio Alves Pereira e à Dra. Adriana Fontes Zimmermann por terem cedido seus pacientes.

Obrigada, Mayara

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis."

Fernando Pessoa

Resumo

Aproximadamente 3% da população humana sofre de alguma disfunção autoimune, na qual pode partilhar genes em comum e também um mesmo mecanismo base. Doenças autoimunes são multifatoriais, com fatores genéticos e ambientais interagindo, determinando o aparecimento e evolução da doença. Espécies reativas de oxigênio parecem participar na susceptibilidade à artrite reumatóide (AR) e ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) e na gravidade em que as doenças se manifestam. As glutathione transferases (GSTs) catalisam a conjugação da glutathione, reduzindo a reatividade e citotoxicidade dos metabólitos reativos e conferem proteção contra o estresse oxidativo e alterações imunogênicas nas moléculas de proteína, RNA e DNA. A GSTP1 é a isoenzima GST dominante na maioria dos tecidos extra-hepáticos, sendo bastante abundante nos tecidos epiteliais humanos. A troca de aminoácido devido ao polimorfismo *GSTP1* A313G causa uma diminuição na atividade enzimática. Os objetivos deste trabalho foram investigar a associação do polimorfismo citado e dados epidemiológicos em AR e LES na população de SC, em estudo caso-controle, bem como averiguar as frequências alélicas e genotípicas do *locus GSTP1* +313. Foram coletadas amostras de sangue periférico de indivíduos controle (n=146) e casos com AR (n=95) e LES (n=88). Para a identificação da variabilidade, utilizou-se a técnica PCR-RFLP. Foram obtidas as frequências alélicas de 0,356 para o alelo variante do gene *GSTP1* nos controles e 0,368 e 0,386 em AR e LES respectivamente, semelhantes a outras populações de origem européia. As frequências genotípicas estão homogeneamente distribuídas entre controles e casos para o polimorfismo *GSTP1* A313G. Foi encontrada associação entre o tabagismo e LES ($OR=1,960$, $p=0,037$) e forte associação entre tabagismo e Fator reumatóide em AR ($OR=4,210$, $p=0,006$), e proteção entre AR e uso de anticoncepcionais ($OR=0,417$, $p=0,008$), porém, não foi encontrada associação entre o polimorfismo *GSTP1* A313G e as doenças, ou entre o polimorfismo estudado e dados clínicos e epidemiológicos.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Frequências populacionais e agrupamento familiar em doenças autoimunes. Fonte: CRISWELL (2008)..... 18

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados na reação de PCR para análise do polimorfismo A313G do gene *GSTP1* (GHOBADLOO *et al.*, 2004).29

Tabela 3 - Tabela 2x2 para cálculo de *OR*, mostrando as classes A, B que indicam presença e ausência do fator estudado em casos e C e D, presença e ausência do fator em controles..... 31

Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas em controles e casos (AR e LES) para o polimorfismo *GSTP1* A313G. 35

Tabela 5 - Cálculo de *Odds Ratio* e intervalo de confiança (IC 95%) em estudo de associação da presença do alelo *GSTP1**G e dos genótipos *GSTP1**G*G, *A*G e *A*A em pacientes com AR e controles. 35

Tabela 6 - Cálculo de *Odds Ratio* e intervalo de confiança (IC 95%) em estudo de associação da presença do alelo *GSTP1**G e dos genótipos *GSTP1**G*G, *A*G e *A*A em pacientes com LES e controles..... 36

Tabela 7 - Cálculos de *Odds Ratio* e IC (95%) relacionando o uso de anticoncepcional à AR e LES..... 38

Tabela 8 - Cálculos de *Odds Ratio* e IC (95%) relacionando o tabagismo à AR e LES. 38

Tabela 9 - Associação entre tabagismo e fator reumatóide em AR..... 39

Tabela 10 - Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do *SNP GSTP1* A313G em diversas populações, incluindo a população do presente estudo. 42

Lista de Figuras

- Figura 1 - Visão simplificada da distribuição da susceptibilidade dos alelos entre indivíduos com doenças complexas. O lambda (λ) refere à razão do risco genético. Fonte: CRISWELL (2008)..... 10
- Figura 2 – Mapa dos pontos de checagem de linfócitos B e T, na regulação da autorreatividade. Fonte: GOODNOW *et al.* (2005). 12
- Figura 3 - Esquema hipotético dos eventos no desenvolvimento do LES. Adaptado de KOTZIN (1996). 14
- Figura 4 - Articulação normal (esq.) e articulação afetada pela artrite reumatóide. Células do sistema imune (células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e B) invadindo o líquido sinovial e destruindo a articulação. Adaptado de FELDMANN; BRENNAN (1996). 16
- Figura 5 – Localização cromossomal de *loci* relacionados à susceptibilidade de quatro doenças autoimunes. SLE – lúpus eritematoso sistêmico, RA – artrite reumatóide, AITD – doença tireoidiana autoimune e T1D – *Diabetes mellitus* tipo 1. Fonte: ABBAS; LICHTMAN (2005). 19
- Figura 6 - Sequência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformação dos xenobióticos, através das enzimas de fase I e das enzimas de fase II (dentre elas as GSTs). Adaptado de GUEMBAROVSKI; CÓLUS (2001). 21
- Figura 7 - Representação esquemática de genes polimórficos, cujas enzimas estão envolvidas no metabolismo do estrogênio. Fonte: MITRUNEM; HIRVONEM (2003). 22
- Figura 8 - Localização do gene *GSTP1* no cromossomo 11. Fonte: GENETICS HOME REFERENCE (2009). 23
- Figura 9 - Representação esquemática do gene *GSTP1*, com destaque para os sete retângulos, que correspondem aos éxons. Os retângulos de cor azul representam regiões não traduzidas, os de cor vermelha, regiões codificantes, e as linhas representam os íntrons, não transcritos. Fonte: NCBI (2009). 23
- Figura 10 - Imagem de gel de agarose 3%, mostrando o marcador de peso molecular na raia 1, fragmento do gene *GSTP1* resultante do produto de PCR na raia 9, e os diferentes genótipos encontrados para o polimorfismo A313G, após digestão com enzima de restrição nas raias 3 (GG), 4 (AG) e 5 (AA). 30
- Figura 11 - Distribuição etária dos grupos com Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e controles em classes de variação de 10 anos. 32

Figura 12 - Distribuição sexual dos indivíduos amostrados nos grupos de pacientes com AR e LES e no grupo controle..... 33

Figura 13 - Naturalidade de casos e controles quanto aos estados e regiões do Brasil..... 34

Figura 14 - Frequências étnicas dos grupos amostrados de AR, LES e controle. 34

Sumário

1	Introdução	10
1.1	Autoimunidade	11
1.1.1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	13
1.1.2	Artrite Reumatóide	15
1.2	Fatores de Risco	16
1.2.1	Fatores Ambientais	16
1.2.2	Genética da Autoimunidade	17
1.3	Polimorfismos Genéticos	20
1.4	Proteína Glutathione S-transferase	20
1.5	Gene <i>GSTP1</i> e seus Polimorfismos	23
2	Justificativa	25
3	Objetivos	26
3.1	Objetivos Gerais	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	Materiais e Métodos	27
4.1	Aspectos Éticos	27
4.2	Coleta de Material	27
4.2.1	Caracterização dos Indivíduos Amostrados	27
4.3	Separação das Amostras	28
4.4	Extração e Quantificação do DNA	28
4.5	Genotipagem	28
4.6	Análise Estatística	30
5	Resultados	32
5.1	Caracterização das Amostras	32
5.2	Análise do Polimorfismo <i>GSTP1</i> A313G	35
5.3	Dados Clínicos e Epidemiológicos	36
6	Discussão	40
6.1	Análise do Polimorfismo	41
6.2	Análise de Associação	43
7	Conclusões	45
	Referências	46
	Anexo A	51
	Anexo B	55
	Anexo C	60
	Anexo D	62
	Anexo E	63

1 Introdução

Muitas doenças humanas são hoje reconhecidas como doenças complexas. Essas doenças não possuem características mendelianas, onde apenas um gene resulta no fenótipo, mas sim possuem vários *loci* envolvidos na doença, além de fatores não genéticos também relacionados (figura 1). Possuem uma heterogeneidade genética que pode estar relacionada com diferentes manifestações clínicas ou com a diversidade étnica (CRISWELL, 2008). Constituem este grupo as doenças autoimunes, os distúrbios neurológicos e neurodegenerativos e doenças como hipertensão, diabetes, obesidade e câncer (BACK, 2007). Fatores genéticos também têm um papel em determinar a progressão clínica da doença, e a identificação desses fatores oferece uma área fértil para o desenvolvimento de terapias preventivas direcionadas (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

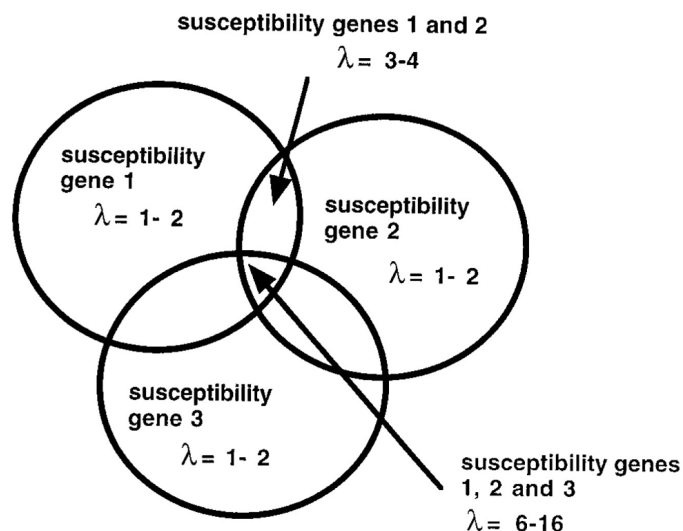


Figura 1 - Visão simplificada da distribuição da susceptibilidade dos alelos entre indivíduos com doenças complexas. O lambda (λ) refere à razão do risco genético. Fonte: CRISWELL (2008).

O sistema imunológico tem como função a defesa do organismo contra substâncias estranhas (não-próprias), incluindo vírus e bactérias além de macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Quando um corpo estranho entra em contato com o organismo, há um

desencadeamento de processos para a eliminação do mesmo. Células do sistema imune inato e adaptativo são ativadas, liberando compostos, para a mediação da resposta imune mais adequada (JANEWAY *et al.*, 2002).

Linfócitos T CD4⁺ reconhecem os antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC) e modulam a resposta inflamatória através de citocinas. Essas citocinas podem estimular a produção de anticorpos contra esses antígenos pelos linfócitos B ou estimular a destruição de células que tenham o antígeno presente através da ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Os complexos formados pela associação entre anticorpos e seus antígenos podem lesar os tecidos ao ativar o sistema complemento e ao ocupar receptores Fc nos macrófagos e em outras células inflamatórias, desencadeando a resposta imune (JANEWAY *et al.*, 2002). Nas doenças autoimunes, o sistema imune não consegue diferenciar algumas das moléculas e células do próprio organismo das exógenas. Apesar dos avanços no conhecimento dos processos imunes envolvidos na autoimunidade, os motivos que disparam essa falta de tolerância ao próprio ainda não são claros (JANEWAY *et al.*, 2002; HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009).

1.1 Autoimunidade

Aproximadamente 3% da população humana sofre de alguma disfunção autoimune. Algumas destas disfunções podem partilhar genes e também um mesmo mecanismo base (GREGERSEN; BEHRENS, 2006). Muitas doenças autoimunes parecem resultar de uma falha na manutenção da tolerância das células T. Acredita-se também que é possível agentes externos, ao qual todo mundo possa ser exposto, causar uma reação anormal do sistema imunológico em indivíduos que são susceptíveis a desenvolver a doença (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000).

As mulheres são mais afetadas nas doenças autoimunes em relação aos homens. Segundo Hewagama e Richardson (2009), há duas hipóteses com relação às causas que levam a maior incidência em mulheres. Elas podem estar ligadas aos hormônios femininos, que geram maiores respostas imunes mediadas pelos linfócitos do tipo Th1, ou então devido aos mecanismos

epigenéticos de inativação do segundo cromossomo X, que pode interferir na metilação do DNA e reconhecimento das moléculas pelo sistema imune.

A tolerância ao próprio se dá na formação de células T e B no timo e medula óssea, respectivamente. No caso das células T que regulam toda a resposta imune, há uma seleção destas a partir da apresentação de várias moléculas MHC (*Major Histocompatibility Complex*) no caminho que o linfócito percorre dentro do timo. Assim, se houver uma interação muito forte ou muito fraca entre o MHC e seu receptor presente na célula T, esta célula é eliminada antes mesmo de sair do timo (figura 2). No caso de células B, esta seleção pode ser devido ao fracasso em produzir um rearranjo dos genes da cadeia leve que irão formar os anticorpos. Além disso, células B que apresentam uma autorreatividade também são eliminadas antes que atinjam a maturidade (JANEWAY *et al.*, 2002) (figura 2).

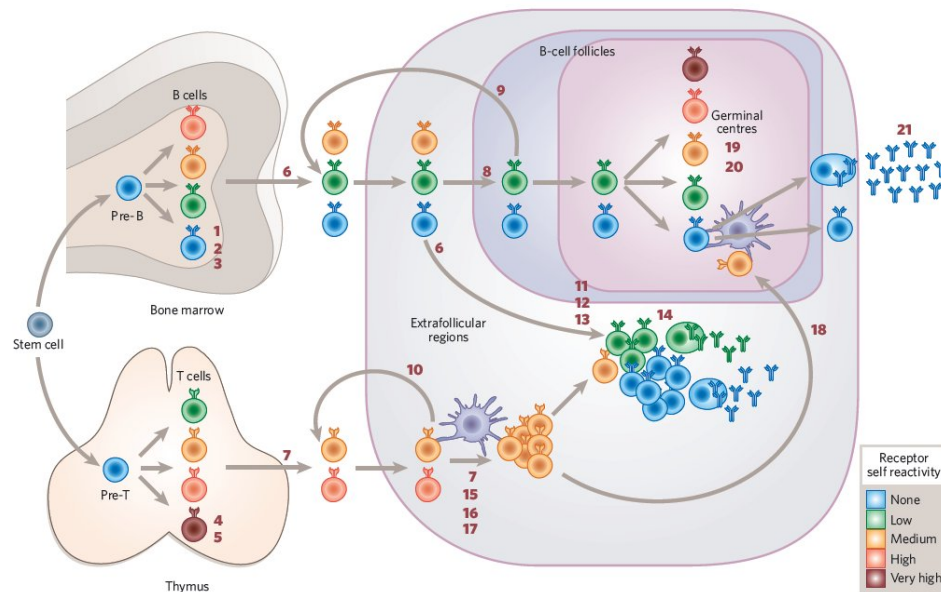


Figura 2 – Mapa dos pontos de checagem de linfócitos B e T, na regulação da autorreatividade. Fonte: GOODNOW *et al.* (2005).

Em detrimento dessa complexidade, o estudo de doenças autoimunes e suas relações genéticas e ambientais como fatores de risco se tornam mais trabalhoso, podendo apresentar inúmeros fatores causando um pequeno impacto sobre o risco de desenvolvimento da doença (CRISWELL, 2008). Ademais, pode ser desafiador distinguir efeitos genéticos relacionados a uma

única desordem, múltiplas desordens autoimunes cruzadas, ou efeitos genéticos específicos a uma manifestação clínica particular da doença (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

1.1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é considerado como o protótipo das doenças autoimunes sistêmicas. É uma doença complexa, capaz de atingir múltiplos órgãos e suas manifestações clínicas são muito diversas e variáveis (KOTZIN, 1996).

Apesar de o LES ocorrer em qualquer idade, é mais comum a manifestação da doença em mulheres na idade reprodutiva. A proporção entre mulheres e homens é de 9:1 para pacientes entre 15 e 50 anos, porém, de 2:1 para pacientes durante a infância ou no período pós-menopausa (BORBA *et al.*, 2008). A prevalência da doença varia entre 14 e 50 casos para cada 100.000 habitantes de acordo com estudos epidemiológicos feitos nos Estados Unidos. No Brasil não há estudos epidemiológicos realizados, porém estima-se entre 16.000 a 80.000 casos (SATO *et al.*, 2002; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009). O LES pode ocorrer em todas as etnias e em todas as partes do mundo, com maior incidência em africanos e seus descendentes (KOTZIN, 1996; KARLSON *et al.*, 2007).

O LES não apresenta nenhum padrão clínico que seja característico à doença. As complicações iniciais do LES nos pacientes envolvem a inflamação, vasculite, depósito de imunocomplexos entre outros. Apresenta-se como uma doença aguda ou insidiosa em seu início e com uma evolução crônica, que tem por característica períodos de atividade inflamatória e remissão desta, com frequente estado febril e caracterizada, principalmente, por lesões na pele, articulações, rins e membranas serosas (SATO *et al.*, 2002). O comprometimento dos rins se mostra de forma grave em 75% dos pacientes, aproximadamente metade das pessoas manifesta dor torácica pleurítica e, próximo de 80% dos casos demonstram anemia normocítica e normocrômica (EGNER, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009). Com uma menor frequência, podemos observar inflamações no cérebro, levando a distúrbios dos processos mentais e comportamento aberrante, como psicose

ou depressão, podendo ocorrer convulsões, paralisias de nervos cranianos, enxaqueca, acidentes vasculares cerebrais, entre outros (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009).

Lúpus eritematoso sistêmico apresenta alterações da resposta imunológica, com presença de diversos anticorpos imunoglobulina G (IgG) dirigidos contra o próprio organismo, sendo a quantidade elevada no nível de anticorpos contra constituintes nucleares a principal característica da doença. Autoanticorpos para fosfolípídios também são bastante frequentes em pacientes com LES, e associados com complicações trombóticas (ABBAS; LICHTMAN, 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009).

A sensibilização das células B autorreativas contra antígenos próprios aparentemente ocorre através da expansão clonal e mutações somáticas nos genes das imunoglobulinas. Esses processos mimetizam uma resposta imune normal contra um patógeno, dependente de células T CD4+, na qual envolvem mecanismos de mutações somáticas e a mudança das classes de anticorpos de IgM para IgG. Ao contrário de outras doenças autoimunes, linfócitos T aparentam não ter um efeito direto na destruição do tecido, apesar deles estarem envolvidos na produção de autoanticorpos (KOTZIN, 1996) (figura 3).

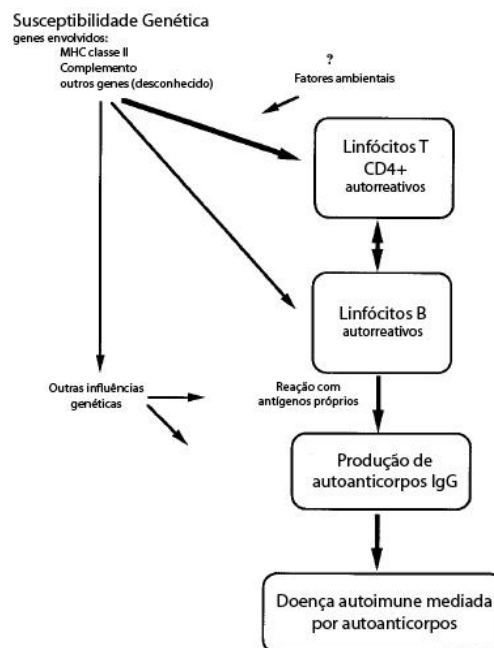


Figura 3 - Esquema hipotético dos eventos no desenvolvimento do LES. Adaptado de KOTZIN (1996).

1.1.2 Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, caracterizada pela inflamação crônica e destruição das articulações sinoviais, de forma progressiva (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). A AR pode ocorrer em qualquer idade e sua incidência aumenta com a mesma, sendo mais freqüente entre os 20 e 45 anos, principalmente por volta dos 30 anos, afetando de 2 a 3 vezes mais o sexo feminino que o masculino (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2009).

As manifestações clínicas da artrite envolvem dor, calor, inchaço e simetria das articulações afetadas, movimentos limitados, rigidez matinal, fraqueza, fadiga (LYNN *et al.*, 1995). A AR afeta primeiramente as articulações de mãos e pés, seguindo para articulações mais próximas ao tronco (FIRESTEIN, 2003). Porém, por se tratar de uma doença complexa, o quadro clínico varia de pessoa para pessoa.

A AR é uma forma comum de artrite que causa inflamação no revestimento das articulações, na membrana sinovial. Além disso, há infiltração de células derivadas de um tecido chamado *pannus* (células T de memória, células B, macrófagos e células do plasma), que invadem e destroem as estruturas articulares locais (FELDMANN; BRENNAN, 1996; FIRESTEIN, 2003) (figura 4). Se esta inflamação persistir ou não responder bem ao tratamento pode ocorrer destruição dos tecidos vizinhos como cartilagem, ossos, tendões e ligamentos, que frequentemente gera deformação e incapacidade funcional da articulação, que pode ser permanente. A doença é capaz de persistir por muitos anos e tipicamente afeta várias articulações ao longo do corpo (ARTHRITIS FOUNDATION, 2000).

A primeira pista da autorreatividade da artrite foi a identificação do “fator reumatóide” no sangue de pacientes afetados. Esse fator é identificado como um anticorpo que se liga à porção Fc das imunoglobulinas. Isto levou a crer que a AR é uma doença autoimune causada por anticorpos reativos. Esses fatores reumatóides e outros anticorpos fixariam o sistema complemento e liberariam fatores quimiotáticos como o C5a (componente do complemento 5). Células inflamatórias seriam então guiadas por essas quimiocinas para as

articulações, onde seriam ativadas e contribuiriam com a destruição local. Apesar disso, o complexo imune, formado pela ação dos autoanticorpos, não é o único fator envolvido na AR. O fato das células T também se infiltrarem no líquido sinovial sugere que essas células são peças chave no processo através da apresentação de antígenos e subsequente regulação da produção de anticorpos (FIRESTEIN, 2003).

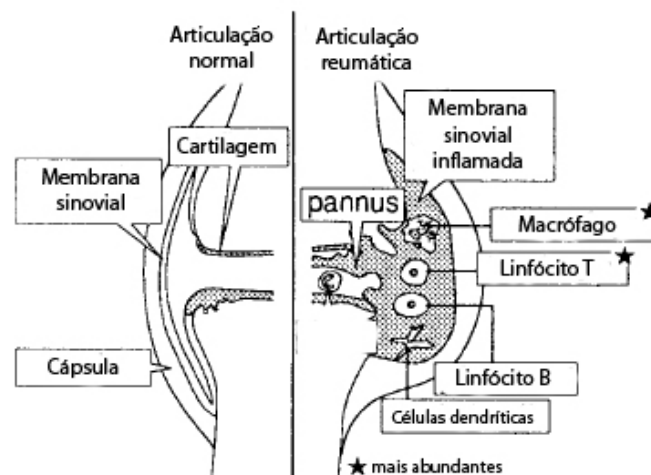


Figura 4 - Articulação normal (esq.) e articulação afetada pela artrite reumatóide. Células do sistema imune (células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e B) invadindo o líquido sinovial e destruindo a articulação. Adaptado de FELDMANN; BRENNAN (1996).

1.2 Fatores de Risco

1.2.1 Fatores Ambientais

Acredita-se que potenciais ativadores ambientais do LES podem incluir radiação ultravioleta, componentes xenobióticos orgânicos e inorgânicos, pó de sílica e agentes infecciosos, como o vírus do Epstein-Barr (KARLSON *et al.*, 2007). Os hormônios sexuais femininos, principalmente o estrogênio, aparentam ter grande participação no LES. Esse fato é corroborado pela proporção de mulheres afetadas com relação aos homens e anormalidades no metabolismo do estrogênio, encontradas tanto em homens quanto em mulheres com LES (LAHITA; BRADLOW, 1987 *apud* BACK, 2007).

Sabe-se que o hábito de fumar tem influência no sistema imune (MÁSDÓTTIR *et al.*, 2000). Estudos demonstram associação de fatores

ambientais e genéticos na patogenia da AR e LES, através do tabagismo e a susceptibilidade dos genes. Como e se o hábito de fumar realmente influencia na doença é desconhecido (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). Segundo MÁSDÓTTIR *et al.* (2000), indivíduos que fumam mais de 20 maços de cigarro por ano, desenvolvem uma doença mais agressiva que aqueles que fumam pouco ou não fumam. Há evidências de que as espécies reativas de oxigênio e seus produtos influenciam na AR, causando oxidação do DNA e lipídios e aumentando a variedade de produtos citotóxicos nos tecidos afetados (MATTEY *et al.*, 1999).

Para a AR há outros fatores ambientais relacionados com o desenvolvimento da doença. Estes incluem, por exemplo, a alimentação baseada em proteína e peso alto no nascimento, que aumentariam o risco do desenvolvimento da doença, enquanto que o uso de anticoncepcionais, ingestão de álcool e amamentação trariam proteção à doença. Porém, muitos desses caracteres não são completamente elucidados na sua real ligação com o aumento de proteção ou risco (LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2009).

1.2.2 Genética da Autoimunidade

Nos últimos anos, houve grande avanço do descobrimento de novos genes associados ao desenvolvimento do LES e AR. Desde 2007, mais de 20 genes foram descobertos como fatores de susceptibilidade ao LES (MOSER *et al.*, 2009), e vários desses *loci* são comuns às doenças autoimunes (figura 5).

Assim como nas demais doenças autoimunes, fatores genéticos e ambientais podem estar relacionados com o surgimento do LES. Segundo CRISWELL (2008), esses fatores genéticos teriam uma responsabilidade maior no lúpus, devido ao fato de a razão entre o risco da doença entre parentes de um indivíduo afetado e a frequência da doença na população, ser maior que nas demais doenças autoimunes (tabela 1). Uma significativa diferença no desenvolvimento da doença entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos dá suporte à base genética do lúpus (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). A heterogeneidade do LES tem confundido estudos genéticos de associação e seus mecanismos patogênicos (KOTZIN, 1996).

Verifica-se uma contribuição genética maior que 50% para a AR através de estudos comparativos entre gêmeos e familiares, sendo que há uma alta taxa de concordância em gêmeos monozigóticos, entre 12 e 30%. A AR também é mais prevalente em parentes de primeiro grau de indivíduos afetados (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009).

Tabela 1 - Frequências populacionais e agrupamento familiar em doenças autoimunes. Fonte: CRISWELL (2008).

Doença Autoimune	Frequência na População (%)	Risco Familiar (%)	λ_s
Psoríase	2,8	17	6
Artrite Reumatóide	1,0	8	8
Diabetes Tipo 1	0,4	6	15
Doença de Graves	0,5	7,5	15
Esclerose Múltipla	0,1	2	20
Lúpus Eritematoso Sistêmico	0,05	1,5	30

λ_s = razão do risco entre parentes de um indivíduo afetado pela frequência da doença na população.

Genes da região 6p21.3 (braço curto do cromossomo 6), onde localizam-se os genes do HLA (*Human Leukocyte Antigen*) apresentam forte associação ao LES e AR (figura 5). Apesar disso, não se sabe exatamente qual gene desta região poderia estar levando a um maior risco de susceptibilidade ao LES, já que é uma área que apresenta forte desequilíbrio de ligação (CRISWELL, 2008). Os alelos variantes de *HLA-DRB1* (HLA de classe II) são bem caracterizados para a predisposição à AR. Mais de 80% dos indivíduos euro-descendentes, afetados por AR, expressam os alelos *DR1* ou *DR4* (FELDMANN; BRENNAN, 1996). Porém, o risco familiar pelos genes HLA é estimado em 30%, sugerindo que outros genes não-HLA também tenham papel significativo na susceptibilidade à artrite reumatóide (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). Como a função do receptor *HLA-DR* é apresentar os peptídeos à célula T CD4+, essa associação genética implica em um papel das células T em algum estágio da doença (FELDMANN; BRENNAN, 1996).

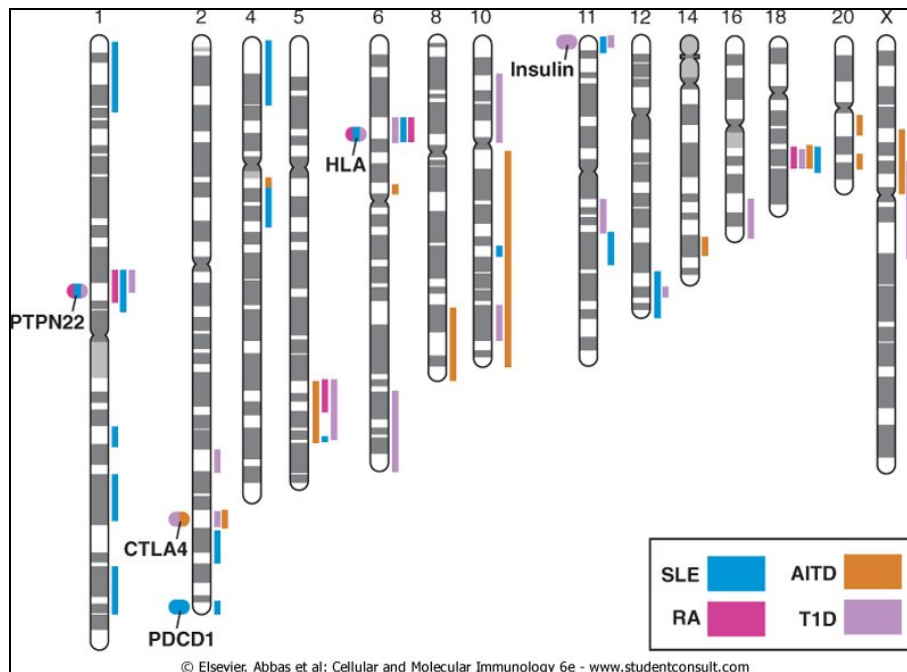


Figura 5 – Localização cromossomal de *loci* relacionados à susceptibilidade de quatro doenças autoimunes. SLE – lúpus eritematoso sistêmico, RA – artrite reumatóide, AITD – doença tireoidiana autoimune e T1D – *Diabetes mellitus* tipo 1. Fonte: ABBAS; LICHTMAN (2005).

Além dos genes da região do HLA, outros que também já são comprovados como tendo relação no LES incluem componentes da via de ativação do complemento e receptores Fc de IgG, entre outros (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009). Genes do complemento estão fortemente associados ao desenvolvimento do LES, assim como outros genes ligados ao sistema imune (MOSER *et al.*, 2009). Foi verificada uma associação do LES com dois genes localizados no cromossomo X. Um desses genes estaria envolvido no processo de metilação de outros genes, aumentando ou diminuindo a expressão de componentes importantes no desenvolvimento a doença (MOSER *et al.*, 2009).

Além dos genes da região do HLA, outros genes relacionados na artrite são receptores de Fc de IgG, enzimas relacionadas na catalização de peptídeos citrulinados (*PADI-4*), o *PTPN22* (associado com outras doenças autoimunes, inclusive LES), envolvido na via de ativação intracelular de células T (OLIVER; WORTHINGTON; SILMAN, 2006).

1.3 Polimorfismos Genéticos

Do genoma humano, apenas 0,1% da sequência contém variações na população. Essas variações, chamadas de polimorfismos, surgem através de mutações, as quais se tornam frequentes nas populações. As variações mais frequentes são os chamados *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphism*), mudanças de apenas um nucleotídeo. Estes *SNPs* são abundantes, estáveis e bem distribuídos ao longo do genoma. A mudança de um nucleotídeo pode levar a uma mudança de aminoácido, quando esta é uma mudança não-sinônima, e conseqüentemente, pode levar a uma alteração na atividade ou função de uma proteína (SHASTRY, 2002).

Essas variações estão associadas com diversidade na população, individualidade, susceptibilidade a doenças, e respostas individuais a fármacos. Atualmente, tem se sugerido que *SNPs* podem ser usados em estudos farmacogenéticos. Apesar disso, não se sabe até que ponto cada polimorfismo interfere no desenvolvimento e tratamento de doenças. A maioria das doenças complexas e desordens comuns são causadas por uma combinação de fatores multigênicos e ambientais (doenças multifatoriais). Ainda assim, esses *SNPs* disponibilizam um ponto de partida para as pesquisas (SHASTRY, 2002).

1.4 Proteína Glutathione S-transferase

Três famílias principais abrangem enzimas com atividade de “transferência” da glutathione. Essas famílias são divididas em GSTs citosólicas, mitocondriais e microsossomais. A família das GSTs citosólicas representam a maior destas famílias (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). A expressão das GSTs é regulada pela exposição a pró-oxidantes. Esses achados indicam que a indução da GST é uma resposta conservada evolutivamente nas células contra o estresse oxidativo (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Baseado na sequência de aminoácidos, sete classes de GSTs citosólicas são reconhecidas em mamíferos, chamadas de Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005). Estudos indicam que a perda desses genes pode aumentar a susceptibilidade a doenças inflamatórias como a asma e alergias, aterosclerose, artrite reumatóide e esclerose sistêmica (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

Em geral, reações catalisadas pelas GSTs são consideradas detoxificantes e servem para proteger macromoléculas celulares de danos causados por fatores ambientais, incluindo xenobióticos (MAGNO *et al.*, 2009). Estes são substâncias químicas naturais ou artificiais que invadem o corpo, como drogas, produtos industriais, pesticidas, poluentes, alcalóides, metabólitos secundários de plantas e toxinas produzidas por fungos, plantas e animais (HATAGIMA, 2002). Outros alvos para essas moléculas são compostos endógenos como lipídios peroxidados e produtos inativados formados como metabólitos secundários durante o estresse oxidativo (MAGNO *et al.*, 2009).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois tipos de enzimas: as de metabolismo mediado pelas oxidases de função mista – ou de Fase I – e as enzimas de conjugação – ou de Fase II (LEICHSENDRING, 2005) (figura 6). As GSTs compõem uma superfamília de enzimas que tem um importante papel na fase II da defesa celular contra compostos eletrofílicos tóxicos (JOHANSSON *et al.*, 1998; ZHONG *et al.*, 2006).

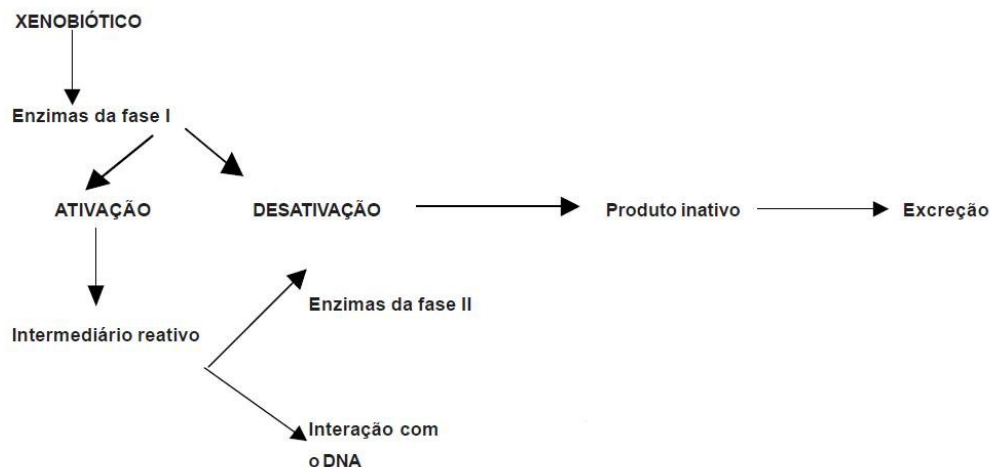


Figura 6 - Sequência dos efeitos biológicos nas reações de biotransformação dos xenobióticos, através das enzimas de fase I e das enzimas de fase II (dentre elas as GSTs). Adaptado de GUEMBAROVSKI; CÓLUS (2001).

As enzimas da família das GSTs modulam os caminhos da conjugação da glutathione nos metabólitos de alta reatividade para os componentes orgânicos, reduzem a reatividade e citotoxicidade dos metabólitos reativos e

conferem proteção contra o estresse oxidativo e alterações imunogênicas nas moléculas de proteína, RNA e DNA (KARLSON *et al.*, 2007). Essas enzimas estão também intimamente ligadas à biossíntese de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona e progesterona, além da degradação da tirosina (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005) (figura 7).

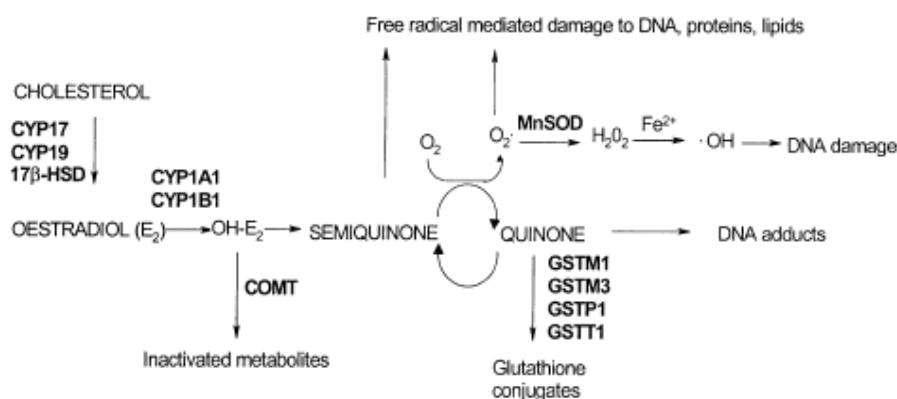


Figura 7 - Representação esquemática de genes polimórficos, cujas enzimas estão envolvidas no metabolismo do estrogênio. Fonte: MITRUNEM; HIRVONEM (2003).

As GSTs catalisam a conjugação da glutatona (GSH) em um centro eletrofílico dos compostos tóxicos, desativando-os. O resultado dessa conjugação é um ácido mercaptúrico, que pode ser excretado pela urina. O sítio ativo da GST é composto por dois sub-sítios, o local onde a glutatona se liga (sítio-G) e o local hidrofóbico onde a enzima liga-se ao substrato (sítio-H) (JOHANSSON *et al.*, 1998).

A GSTP1 é a isoenzima GST dominante na maioria dos tecidos extra-hepáticos, sendo bastante abundante nos tecidos epiteliais humanos, principalmente no pulmão, esôfago e placenta. Encontra-se superexpressada em muitas formas tumorais (JOHANSSON *et al.*, 1998; AUTRUP, 2000).

A quantidade e especificidade das isoenzimas GST presentes na célula afetam a biotransformação dos compostos tóxicos e a existência de diferentes variantes da enzima GSTP1 podem influenciar na capacidade de detoxificação da célula (JOHANSSON *et al.*, 1998).

Glutathione transferases são de interesse de farmacologistas e toxicologistas, pois elas provêem alvos para terapias anti-asmáticas e anti-tumorais, e metabolizam agentes quimioterápicos, inseticidas, herbicidas,

carcinógenos, e produtos do stress oxidativo (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

1.5 Gene *GSTP1* e seus Polimorfismos

Pelo menos sete famílias gênicas Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta foram identificadas e polimorfismos genéticos foram descritos para *GSTM1*, *GSTP1* e *GSTT1*, resultando em decréscimo ou alteração da atividade enzimática (AUTRUP, 2000; HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005).

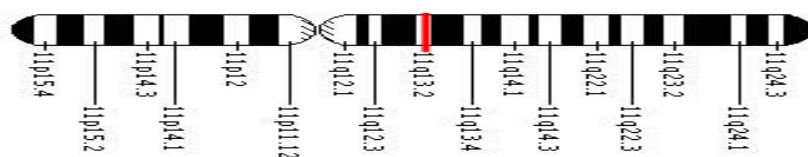


Figura 8 - Localização do gene *GSTP1* no cromossomo 11. Fonte: GENETICS HOME REFERENCE (2009).

O gene *GSTP1* (glutathione S-transferase pi 1) está localizado no braço longo do cromossomo 11, na posição 11q13 (MOSCOW *et al.*, 1988) (figura 8) e possui 7 éxons e um total de 10.059 pb (pares de bases) (figura 9). A enzima *GSTP1*, codificada por este gene, pertence à família das glutathionas S-transferases (GSTs) e possui 210 aminoácidos (NCBI, 2009).



Figura 9 - Representação esquemática do gene *GSTP1*, com destaque para os sete retângulos, que correspondem aos éxons. Os retângulos de cor azul representam regiões não traduzidas, os de cor vermelha, regiões codificantes, e as linhas representam os introns, não transcritos. Fonte: NCBI (2009).

Há dois polimorfismos tipo *SNP* bem descritos para este gene. O primeiro localiza-se no nucleotídeo +313 e representa uma transição de A para G (A313G) e o segundo, uma transição de C para T no nucleotídeo +341 (C341T) (LECOMTE *et al.*, 2006). Essas mudanças levam a alterações nos aminoácidos codificados: de isoleucina para valina no códon 105, (Ile105Val,

A313G) e alanina para valina no códon 114 (Ala114Val, C341T). O aminoácido do códon 105 contribui para a ligação da parte hidrofóbica do sítio ativo da enzima e uma substituição de aminoácidos nessa posição pode afetar a especificidade da enzima ao substrato, e também a estabilidade térmica da enzima (JOHANSSON *et al.*, 1998; PANDYA *et al.*, 2000). Portanto, a mudança no nucleotídeo +313 resulta numa alteração da atividade catalítica (MATTEY *et al.*, 1999).

O polimorfismo A313G pode reduzir a conjugação da glutatona levando assim à diminuição na eficácia dos mecanismos de proteção do corpo contra o estresse oxidativo e aumentando o estrago na fita de DNA (HAYES; FLANAGAN; JOWSEY, 2005; KARLSON *et al.*, 2007).

2 Justificativa

Por décadas, a perda da tolerância a moléculas próprias do organismo vem sendo um dos grandes enigmas para imunologistas. É bem aceito que a patogênese de doenças autoimunes é multifatorial, com fatores genéticos e ambientais interagindo, para determinar o aparecimento e evolução da doença. No entanto, a quantificação de influências ambientais é notoriamente difícil, enquanto inúmeras evidências sugerem que fatores genéticos são os principais determinantes na susceptibilidade e progressão de doenças autoimunes (INVERNIZZI; GERSHWIN, 2009). Entender quais os fatores genéticos que contribuem para essas doenças pode ter um efeito significativo na saúde da população humana (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

Acredita-se que espécies reativas de oxigênio tenham participação na susceptibilidade à artrite reumatóide e ao lúpus eritematoso sistêmico e na gravidade com que estas doenças se manifestam. Os polimorfismos encontrados nas enzimas que participam do processo de detoxificação apresentam variação em sua atividade e, conseqüentemente, podem contribuir no aparecimento e no grau de acometimento das doenças citadas (MATTEY *et al.*, 1999; KARLSON *et al.*, 2007).

Enzimas GSTs são extremamente importantes na metabolização de xenobióticos bem como de espécies reativas de oxigênio, produzidas pelo próprio organismo, em suas reações enzimáticas. Produtos como o cigarro e fármacos em geral podem aumentar a quantidade de substratos no qual esta enzima atua, e um polimorfismo pode alterar a velocidade de reação, e conseqüentemente, exposição a fatores ambientais. Essas mudanças podem ocasionar num aumento do risco de desenvolvimento e progressão de uma doença autoimune (MATTEY *et al.*, 1999; ROSSINI *et al.*, 2002; KARLSON *et al.*, 2007).

Em Santa Catarina, assim como no Brasil, há poucos estudos com a genética e epidemiologia de tais doenças. Devido a grande miscigenação brasileira e características singulares da população, vê-se a importância de tal análise.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo verificar a associação do polimorfismo do gene *GSTP1* A313G com as doenças autoimunes Artrite Reumatóide (AR) e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), comparando indivíduos sem as duas doenças e indivíduos com AR ou LES (estudo caso-controle) em Santa Catarina.

3.2 Objetivos Específicos

- Ampliar o número de amostras de indivíduos com AR ou LES (casos) e indivíduos sem as duas doenças (controles) existentes no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), através da coleta de material biológico e aplicação de questionários epidemiológicos.
- Criação de um banco de dados, com os genótipos, dados epidemiológicos e informações clínicas dos indivíduos com AR ou LES.
- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do *SNP* A313G do gene *GSTP1*, em casos e controles.
- Avaliar o papel dos alelos de *GSTP1* A313G na susceptibilidade à AR e ao LES.
- Comparar as frequências alélicas obtidas nas amostras estudadas com amostras de outras populações verificadas na literatura.
- Analisar dados clínicos e epidemiológicos e a associação destes com o polimorfismo *GSTP1* A313G.

4 Materiais e Métodos

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto maior, em vigência, intitulado: *GENÉTICA DA AUTOIMUNIDADE: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatóide em pacientes de Santa Catarina*, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), no parecer de número 172/06, de 26/06/2006. Este projeto foi aprovado no edital universal 003/2006 da FAPESC, estando em vigência até dezembro de 2009.

4.2 Coleta de Material

4.2.1 Caracterização dos Indivíduos Amostrados

Durante a realização da pesquisa, foram coletados dados epidemiológicos (sexo, idade, origem étnica, naturalidade) e clínicos de 95 indivíduos diagnosticados com Artrite Reumatóide e 88 com Lúpus Eritematoso Sistêmico, no Hospital Universitário (ANEXO A e ANEXO B), além de 146 indivíduos controles, sem evidências de doenças autoimunes ou histórico familiar das mesmas (ANEXO C), formado de indivíduos submetidos a exames de rotina no laboratório de análises clínicas e doadores do banco de sangue do HU, voluntárias do Hospital Florianópolis e participantes do Núcleo de Estudos da Terceira Idade (NETI) da UFSC.

Para complementar os questionários dos pacientes, dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. A todos os indivíduos foi dado esclarecimento sobre o projeto e obtido consentimento para participar da pesquisa (ANEXO D e ANEXO E).

Também foram coletadas amostras de sangue periférico por punção venosa, de todos os participantes da pesquisa. Após a coleta, o sangue foi mantido em recipiente com gelo, até ser transportado ao laboratório para tratamento adequado.

4.3 Separação das Amostras

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2500g, por 20 minutos, separando o plasma, a camada de leucócitos (*buffy coat*) e as hemácias. As três camadas foram estocadas a -20°C, sendo o plasma e hemácias guardados para pesquisas futuras, e a camada de *buffy coat* utilizada para extração do material genético.

4.4 Extração e Quantificação do DNA

A extração do DNA foi realizada através do método de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após a extração, o DNA extraído passou a fazer parte de um banco de DNA, organizado a partir do número de matrícula dos indivíduos. O DNA foi estocado a -20°C, sendo utilizado neste projeto e em futuras análises moleculares.

Para quantificação do DNA extraído, uma alíquota de DNA foi diluída e medida a absorbância em 260nm e 280nm em espectrofotômetro (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As amostras foram então diluídas na concentração padrão do laboratório de 20µg/ml, de acordo com a quantificação.

4.5 Genotipagem

O polimorfismo analisado está localizado no éxon 5 do gene *GSTP1*, no códon 105, uma mudança de um único nucleotídeo (SNP), localizado no sítio ativo da enzima transcrita. A genotipagem do SNP A313G foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), seguida de digestão com enzima de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e detecção em gel de agarose corado com GelRed™.

O fragmento de DNA contido entre os iniciadores tem 433pb, abrangendo o polimorfismo estudado. A reação da PCR se deu da seguinte forma: 2,5µl de tampão 10X (10mM de Tris-HCl – pH 8,3), 0,75µl de MgCl₂ (50mM), 0,6µl de desoxinucleotídeos trifosfatado (dNTPs) na concentração de 10mM, 0,25µl de cada iniciador (*forward* e *reverse*) (tabela 2) com concentração de 15 pmol, 0,25µl de Platinum® Taq DNA Polimerase (5U/µl), 5,0µl de DNA

(20ng/μl) e 17,2μl de água ultrapura estéril (adaptado de GHOBADLOO *et al.*, 2004).

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados na reação de PCR para análise do polimorfismo A313G do gene *GSTP1* (GHOBADLOO *et al.*, 2004).

Iniciadores	Sequência dos iniciadores
<i>Foward</i> - PiF2306	5'-GTA GTT TGC CCA AGG TCA AG-3'
<i>Reverse</i> - PiR3800	5'-AGC CAC CTG AGG GGT AAG-3'

A reação foi levada ao termociclador, onde foi realizado o seguinte ciclo de temperaturas: a temperatura é elevada a 92°C por 12 minutos para ativação da enzima *Taq* polimerase, depois, segue-se 15 ciclos de amplificação do DNA a 95°C por 30 segundos, anelamento dos iniciadores a 58°C por 30 segundos e extensão da fita a 72°C por 60 segundos. Em seguida, mais 25 ciclos com temperaturas de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. Para terminar, há uma extensão final da cadeia a 72°C por 5 minutos (GHOBADLOO *et al.*, 2004).

Após a amplificação, realizou-se a digestão com 2,5U da enzima de restrição *BsmAI* (Biolabs, New England), mantidos a 55°C por 2 horas (adaptado de GHOBADLOO *et al.*, 2004). A visualização dos fragmentos obtidos após a digestão foi realizada em gel de agarose 3%, onde as amostras foram coradas com GelRed™. A imagem do gel foi capturada pelo fotodocumentador DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro com auxílio do software GelCapture™. Os fragmentos foram visualizados de três formas distintas, identificando cada genótipo do *SNP* A313G: duas bandas de 329pb e 104pb quando o indivíduo é homozigoto para o alelo ancestral A (AA); quatro bandas de 329pb, 222pb, 107 e 104pb (as duas últimas sem distinção) quando o indivíduo for heterozigoto (AG); ou três bandas de 222pb, 107 e 104pb quando o indivíduo for homozigoto para o alelo variante G (GG) (figura 10) (adaptado de GHOBADLOO *et al.*, 2004).

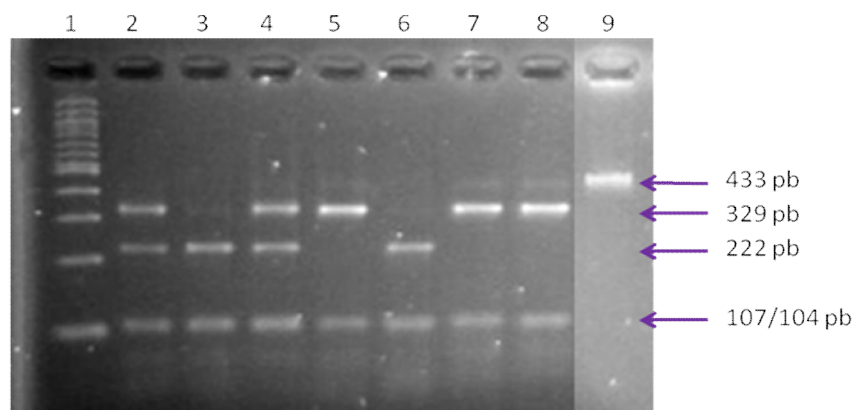


Figura 10 - Imagem de gel de agarose 3%, mostrando o marcador de peso molecular na raia 1, fragmento do gene *GSTP1* resultante do produto de PCR na raia 9, e os diferentes genótipos encontrados para o polimorfismo A313G, após digestão com enzima de restrição nas raias 3 (GG), 4 (AG) e 5 (AA).

4.6 Análise Estatística

As frequências alélicas foram calculadas por contagem direta. Também foi verificado se as distribuições genóticas encontradas nas amostras estudadas se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foram verificadas as homogeneidades entre as amostras controle, de pacientes com AR e LES para a distribuição genotípica de *GSTP1* e para os grupos étnicos.

A estimativa de associação dos alelos estudados para o *SNP* A313G, bem como dos dados clínicos e epidemiológicos, com AR e LES, foi realizada através do cálculo da razão de probabilidade ou *odds ratio* (*OR*), segundo Woolf (1955). O valor apresentado de *OR* se aproxima ao do risco relativo. Este mostra quantas vezes o fator estudado (ex., cada alelo) é mais frequente entre os casos em relação aos controles, ou vice-versa. Calcula-se o *OR* através de uma tabela 2x2 onde são considerados os casos com a presença do fator estudado (A), casos sem o fator (B), controles com o fator (C) e controles sem o fator (D) (tabela 3). Em seguida, realiza-se a equação $(A.D)/(B.C)$. Se algum destes quatro itens for igual a zero, utiliza-se a modificação de Haldane, que tem por fórmula: $OR = [(A+0,5).(D+0,5)/(B+0,5).(C+0,5)]$.

Quando o valor apresentado por *OR* for igual a 1, significa que o fator estudado não está associado com a doença. Se o valor apresentado for maior que 1, implica que o fator estudado pode estar associado com a

susceptibilidade à doença. Mas se o valor de *OR* for menor que 1, sugere uma proteção do fator contra o desenvolvimento da doença.

Tabela 3 - Tabela 2x2 para cálculo de *OR*, mostrando as classes A, B que indicam presença e ausência do fator estudado em casos e C e D, presença e ausência do fator em controles.

	Caso	Controle
Presença do fator	A	C
Ausência do fator	B	D

Para o cálculo de *OR* foi utilizado intervalo de confiança de 95% e valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Como auxílio empregou-se o uso do software EpiMax Table Calculator (Health Decision Strategies, 2004).

5 Resultados

5.1 Caracterização das Amostras

Foi genotipado um total de 329 pessoas, residentes em Santa Catarina, sendo 95 destas, diagnosticadas com Artrite Reumatóide, 88 com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e 146 são pessoas saudáveis, sem histórico dessas doenças em parentes de primeiro grau, que compõem o grupo controle. Para algumas análises, o número amostral sofre modificação devido à obtenção de dados incompletos nos questionários.

A idade de casos e controles variou entre 15 (LES) e 84 anos (AR), sendo a média de 48,00 anos ($\pm 15,47$) para o grupo controle, 54,19 ($\pm 13,03$) anos para casos com AR e 37,85 ($\pm 12,26$) anos em pacientes com LES (figura 11).

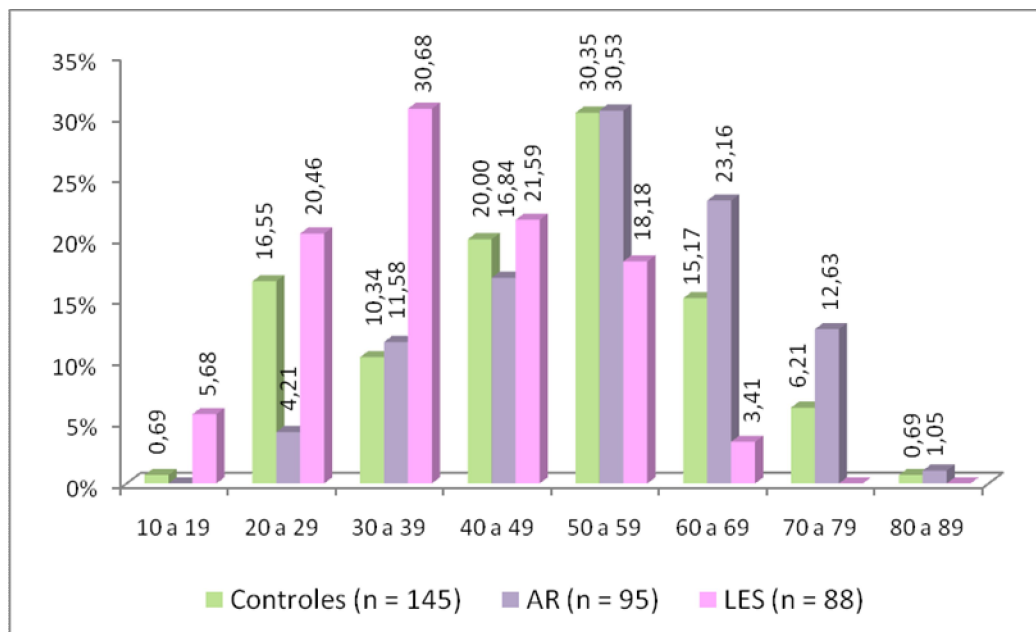


Figura 11 - Distribuição etária dos grupos com Artrite Reumatóide, Lúpus Eritematoso Sistêmico e controles em classes de variação de 10 anos.

Ainda podemos observar que, há uma maior quantidade de mulheres diagnosticadas com LES ou AR em relação a quantidade de homens que apresentam essas doenças (figura 12). A frequência de homens com artrite se

mostra um pouco mais alta quando comparado com a frequência de homens com LES.

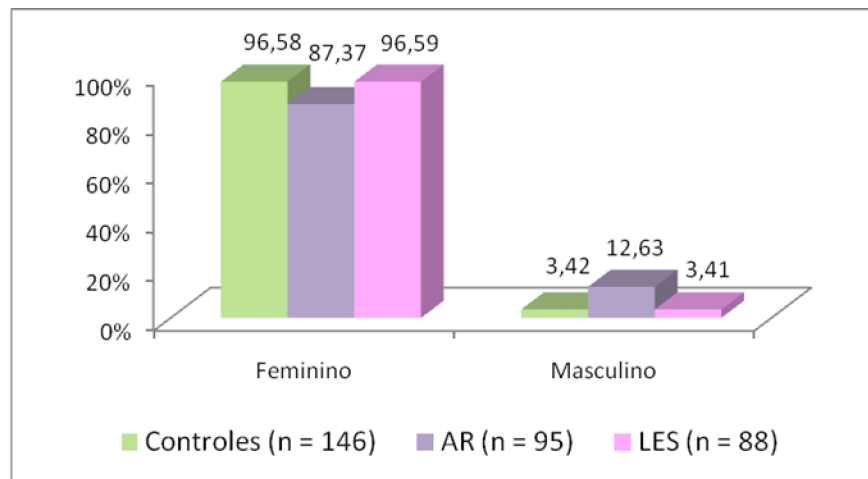


Figura 12 - Distribuição sexual dos indivíduos amostrados nos grupos de pacientes com AR e LES e no grupo controle.

Quanto à naturalidade dos grupos amostrados, a maioria dos participantes desta pesquisa é natural de Santa Catarina. No grupo controle, porém, a incidência de pessoas que nasceram em outros estados é um pouco maior que aquela encontrada em pacientes, assim também como a diversidade dos estados citados (figura 13). Os estados citados que compreendem a Região Nordeste foram SE, CE, BA, PE, PB e RN, todos com apenas um indivíduo natural dos mesmos.

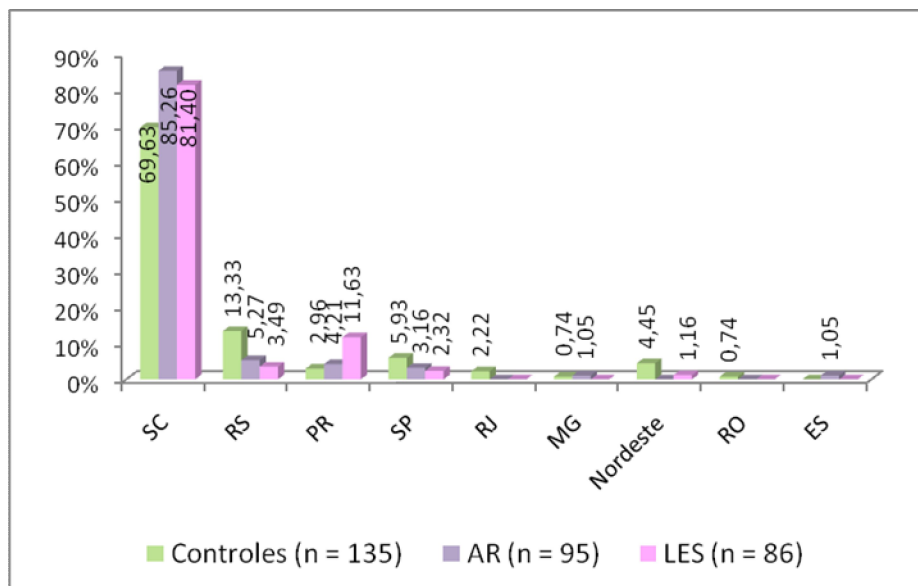


Figura 13 - Naturalidade de casos e controles quanto aos estados e regiões do Brasil.

Na figura 14, podemos observar a composição étnica em casos (AR e LES) e controles, inferida pelos entrevistadores através de características fenotípicas. Os grupos amostrados não se apresentaram homogêneos, quando comparados AR e controle ($\chi^2_{(2)}=8,126$, $p=0,017$) e LES e controle ($\chi^2_{(2)}=10,047$, $p=0,007$) de acordo com os grupos étnicos apresentados. O grupo étnico de afro-descendentes mostra frequência maior em casos com relação aos controles.

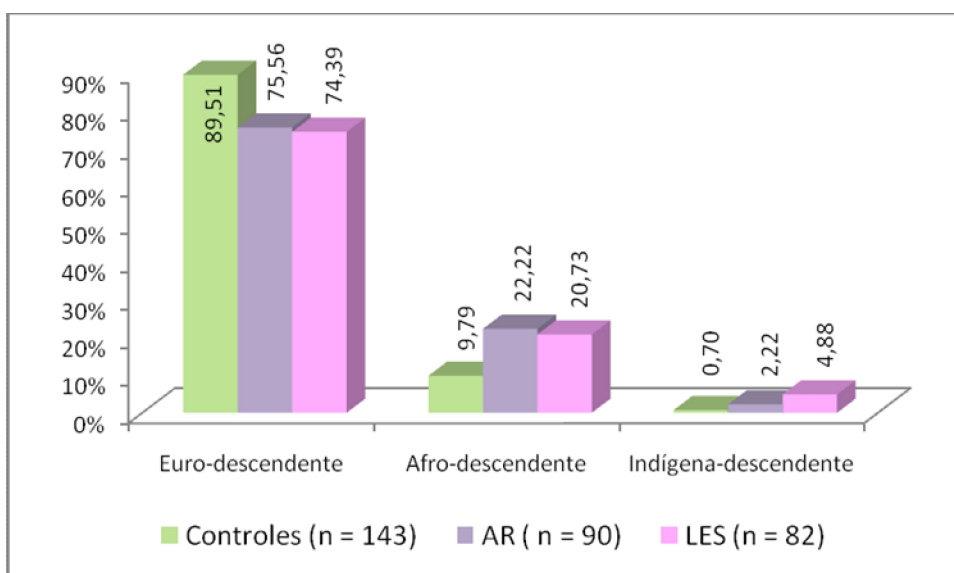


Figura 14 - Frequências étnicas dos grupos amostrados de AR, LES e controle.

5.2 Análise do Polimorfismo *GSTP1* A313G

Na tabela 4 podemos observar as frequências alélicas e genotípicas para os grupos controle e casos com AR e LES.

As frequências genotípicas encontradas nos grupos controle e casos com AR e LES se mostram muito semelhantes e são consideradas estatisticamente homogêneas ($\chi^2_{(4)} = 1,571$; $p = 0,814$). Como visto na tabela 4, controles e casos (AR e LES) apresentaram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas e genotípicas em controles e casos (AR e LES) para o polimorfismo *GSTP1* A313G.

	Controles n = 146 (%)	AR n = 95 (%)	LES n = 88 (%)
Alelos			
A	0,644	0,632	0,614
G	0,356	0,368	0,386
Genótipos			
AA	61 (41,8)	39 (41,1)	32 (36,4)
AG	66 (45,2)	42 (44,2)	44 (50,0)
GG	19 (13,0)	14 (14,7)	12 (13,6)
EHW	$\chi^2_{(1)}=0,026, p=0,872$	$\chi^2_{(1)}=0,229, p=0,632$	$\chi^2_{(1)}=0,262, p=0,609$

EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; (1) = graus de liberdade; p = probabilidade

As tabelas 5 e 6 apresentam o *Odds Ratio* calculado, com intervalo de confiança de 95%, para a associação do polimorfismo estudado (A313G) com as doenças AR e LES, respectivamente.

Tabela 5 - Cálculo de *Odds Ratio* e intervalo de confiança (IC 95%) em estudo de associação da presença do alelo *GSTP1**G e dos genótipos *GSTP1**G*G, *A*G e *A*A em pacientes com AR e controles.

	OR	IC 95%	p
Alelos			
G vs. A	1,054	0,708 – 1,569	0,860
Genótipos			
GG vs. AA/AG	1,155	0,515 – 2,580	0,851
AG vs. AA/GG	0,961	0,552 – 1,670	0,985
AA vs. AG/GG	0,970	0,555 – 1,696	1,000

OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; p = Probabilidade

Tabela 6 - Cálculo de *Odds Ratio* e intervalo de confiança (IC 95%) em estudo de associação da presença do alelo *GSTP1**G e dos genótipos *GSTP1**G*G, *A*G e *A*A em pacientes com LES e controles.

	OR	IC 95%	p
Alelos	1,138	0,759 – 1,706	0,577
G vs. A			
Genótipos			
GG vs. AA/AG	1,055	0,452 – 2,440	1,000
AG vs. AA/GG	1,212	0,689 – 2,132	0,564
AA vs. AG/GG	0,796	0,445 – 1,423	0,495

OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; p = Probabilidade

Como visto, não foi encontrada associação entre o polimorfismo A313G do gene *GSTP1* e AR ou LES quando relacionado com alelos ou genótipos. Os desvios apresentados não se mostraram significativos, mesmo quando os valores de *OR* distanciaram-se de 1.

5.3 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Além da análise de dados genéticos à susceptibilidade ao desenvolvimento de AR ou ao LES, foram analisados alguns dados clínicos e epidemiológicos com relação aos casos (AR e LES). Em artrite reumatóide foram avaliadas as articulações acometidas pela doença, o fator reumatóide, dados hormonais para mulheres e hábito do tabagismo.

Para a AR, as articulações foram divididas de acordo com sua localização. Sendo assim, as articulações afetadas foram classificadas em 1: mãos, pés, punhos e tornozelos; 2: cotovelos, ombros e joelhos, podendo acometer também o primeiro grupo; e 3: quadril, coluna e pescoço e demais articulações. Dos pacientes de AR analisados neste estudo, 18,95% relataram articulações acometidas do grupo 1, 28,42% do grupo 2 e 29,47% do grupo 3, enquanto que 23,16% dos pacientes não relataram problemas nas articulações, num período recente de 10 dias.

Ao analisar o polimorfismo A313G do gene *GSTP1* com as manifestações nas articulações, nenhuma associação significativa foi obtida com alelos ou genótipos (os valores de *OR* encontrados variaram entre 0,771 e 1,967 e *p* entre 0,542 e 1).

Na análise do fator reumatóide, 66,27% dos pacientes apresentaram fator positivo, enquanto que 33,73%, fator reumatóide negativo, de um total de 83 pacientes. Quanto aos dados hormonais, 56,41% de 78 mulheres responderam que já fizeram uso de algum tratamento hormonal, como o uso de anticoncepcional (AC) ou tratamento de reposição hormonal. Já 43,59% afirmaram que nunca haviam feito uso de hormônios sintéticos.

Para o LES, as manifestações aqui analisadas foram a presença de Fenômeno de Raynauld, *Rash* malar e discóide, artrite, distúrbios renais e fotossensibilidade da pele.

Das pessoas que manifestavam a doença, 53,41% se queixaram da presença de artrite, enquanto que 42,05% relataram problemas com fotossensibilidade na pele. Distúrbios renais estiveram presentes em 36,26% dos entrevistados e o Fenômeno de Raynauld, em 19,32%. A presença de *Rash* malar e *rash* discóide foram relatadas por 15,91% e 11,36% dos casos, respectivamente. Dos 88 indivíduos com LES, 15,91% não relataram quaisquer desses sintomas. Ao comparar as características clínicas artrite, fenômeno de Raynauld, fotossensibilidade e distúrbios renais com o polimorfismo estudado, não foi encontrada associação significativa com alelos ou genótipos (valores de *OR* entre 0,578 e 1,041 e *p* entre 0,571 e 1). Além das manifestações analisadas neste trabalho, os pacientes ainda relataram distúrbios neurológicos, febre, fadiga, entre outras manifestações.

Quanto aos dados hormonais, assim como em AR, foi analisado o uso de hormônios tanto em terapia de reposição hormonal como no uso de anticoncepcional, sendo que 66,67% fizeram uso de algum tratamento hormonal em algum momento da vida, e 33,33% de 81 casos com LES nunca o utilizaram.

Para o cálculo de associação entre as doenças e dados hormonais, foi utilizado apenas o uso do AC, e aqueles que fizeram uso de terapia de reposição hormonal foram excluídos. Na tabela 7, podemos ver os resultados obtidos desta análise.

Tabela 7 - Cálculos de *Odds Ratio* e IC (95%) relacionando o uso de anticoncepcional à AR e LES.

	AR	Controles	OR	IC 95%	p
Uso de AC	42	86	0,417	0,214 - 0,808	0,008
Não uso de AC	34	29			
	LES	Controles	OR	IC 95%	p
Uso de AC	50	86	0,624	0,317 - 1,229	0,191
Não uso de AC	27	29			

OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; p = Probabilidade; AC = anticoncepcional

De acordo com os resultados apresentados, o uso do anticoncepcional tem um fator protetor com relação a AR ($p=0,008$), enquanto que em LES não apresentou associação.

Foi realizado o mesmo processo entre o tabagismo e as doenças estudadas. No grupo controle ($n=146$), 26,71% das pessoas entrevistadas relataram ser fumante ou ex-fumante (73,29% não-fumante). No caso da AR ($n=91$), 38,46% alegaram fumar ou já ter fumado (61,54%) afirmaram nunca ter fumado). Para o LES ($n=72$), 41,67% declararam ser fumante/ex-fumante e 58,33% não-fumante. Na tabela 8, pode-se conferir os valores encontrados.

Tabela 8 - Cálculos de *Odds Ratio* e IC (95%) relacionando o tabagismo à AR e LES.

	AR	Controles	OR	IC 95%	p
Fumante/ex-fumante	35	39	1,715	0,944 – 3,117	0,079
Não fumante	56	107			
	LES	Controles	OR	IC 95%	p
Fumante/ex-fumante	30	39	1,960	1,036 – 3,710	0,037
Não fumante	42	107			

OR = *Odds Ratio*; IC = Intervalo de Confiança; p = Probabilidade

Não foi encontrada associação entre o cigarro e AR, apesar do valor de p se aproximar do limite de significância. Já no caso de LES, foi encontrada associação significativa entre o hábito de fumar (no presente ou no passado) e a manifestação da doença ($p=0,037$). Quando observado o tabagismo relacionado ao polimorfismo presente no gene *GSTP1*, os valores de OR obtidos não foram significativos. Foi verificada ainda a relação entre o fator reumatóide e o hábito de fumar, onde se verifica um OR relativamente alto (4,210) e um p significativo ($p=0,006$, tabela 9), evidenciando uma forte associação entre o tabagismo e a presença de fator reumatóide.

Tabela 9 - Associação entre tabagismo e fator reumatóide em AR.

Fator reumatóide	Fumantes	Não-fumantes	OR	IC 95%	p
Positivo	22	18	4,210	1,448 – 12,531	0,006
Negativo	9	31			

OR = Odds Ratio; IC = Intervalo de Confiança; p = Probabilidade

Porém, quando comparado à presença do fator reumatóide e os diferentes genótipos não foi observada qualquer associação significativa (valores de OR variaram entre 0,508 e 1,481 e p entre 0,542 e 0,912).

6 Discussão

Quando comparada a idade entre casos e controles, foi possível observar algumas divergências. De acordo com a figura 11, é possível verificar que os 3 grupos possuem frequências que se aproximam da curva normal, sendo que, enquanto os grupos de pacientes com AR e controle têm uma coincidência maior, a curva normal do grupo de pacientes com LES apresenta um deslocamento da mediana à esquerda, mostrando a incidência desta doença em pessoas mais jovens. Para a AR, houve uma frequência menor de pessoas jovens (20 a 29) em relação aos controles. Essas divergências dificultam o pareamento por idade e podem caracterizar erros amostrais.

Podemos perceber como as doenças acometem pessoas em faixas etárias diferentes. O LES tem como característica o desenvolvimento em mulheres mais novas, durante o período reprodutivo e numa proporção de 9 a 10 mulheres para 1 homem (BORBA *et al.*, 2008). Esta relação entre a incidência em homens e mulheres parece estar relacionada a hormônios femininos (HEWAGAMA; RICHARDSON, 2009), que aumentariam o risco de desenvolvimento da doença. Os hormônios parecem influenciar consideravelmente o risco com relação ao lúpus, já que se trata de pessoas mais novas, ainda em período reprodutivo, enquanto que em artrite, a maior incidência é em mulheres em período pós-menopausa. Outra possível relação pode ser devido a genes de risco presentes no cromossomo X (MOSER *et al.*, 2009).

A figura 10 mostra que a maior parte das amostras são pessoas naturais de Santa Catarina e de estados próximos do sul do país. Pessoas provindas de outras regiões mostram que também há fluxo gênico na população residente em Santa Catarina.

As frequências das populações étnicas encontradas corroboram dados históricos de colonização em Santa Catarina e no sul do país, e estudos genéticos, com maior frequência de euro-descendentes (PARRAS *et al.*, 2003). A maior frequência de afro-descendentes em casos pode estar ligada às doenças. O lúpus, por exemplo, é mais frequente em mulheres norte-americanas de origem afro-descendentes (KOTZIN, 1996; KARLSON *et al.*,

2007). Já em artrite, observa-se que a frequência é igual entre os grupos étnicos, com frequências aumentadas em alguns grupos de ameríndios norte-americanos, e diminuídas em algumas tribos africanas (RADU, 2006). Essa diferença étnica entre casos e controles pode ser explicada também por erros amostrais devido à inferência feita por diferentes entrevistadores.

6.1 Análise do Polimorfismo

Na tabela 10, é possível comparar as frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo A313G do gene *GSTP1* em diferentes populações, além daquelas obtidas através do presente estudo.

De acordo com a tabela 10 podemos observar que as frequências alélicas do presente estudo são mais próximas daquelas encontradas na Bahia e nas populações da Inglaterra, e também das frequências observadas nas populações do Paraná e Rio de Janeiro (euro-descendentes). Podemos observar também, que na população sul-africana e na população afro-descendente (RS) a frequência do alelo variante (G) é maior que aquelas apresentadas nas outras populações. Já nas populações asiáticas apresentadas, podemos observar o contrário: frequência do alelo variante mais baixa em relação às demais. Quando comparadas as frequências genotípicas do presente estudo e demais populações apresentadas, há diferenças em relação às frequências do homozigoto ancestral e heterozigoto, para alguns estudos. Enquanto que neste trabalho a frequência do heterozigoto é maior, na maioria dos casos mostrados acima, o homozigoto ancestral aparece como o mais frequente. Magno *et al.* (2009) encontraram diferenças significativas nas frequências do polimorfismo *GSTP1* A313G entre ameríndios e euro-descendentes e entre ameríndios e afro-descendentes, apresentando uma frequência menor do alelo variante.

Tabela 10 - Distribuição de frequências genotípicas e alélicas do *SNP GSTP1 A313G* em diversas populações, incluindo a população do presente estudo.

População	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G	Publicação
Asiática						
Koreana	68,4	29,1	2,5	0,83	0,17	CHO <i>et al.</i> (2005)
Sul-Indiana	58,4	38,4	3,1	0,78	0,22	VETTRISELVI <i>et al.</i> (2009)
Européia						
Inglaterra ¹	39,7	43,8	16,4	0,62	0,38	FRYER <i>et al.</i> (2000)
Inglaterra ²	45,8	39,7	14,5	0,66	0,34	MATTEY <i>et al.</i> (1999)
Africana						
Xhosa (África do Sul)	22,0	51,0	28,0	0,47	0,53	ADAMS <i>et al.</i> (2003)
Americana						
BR - Bahia	40,5	46,6	12,8	0,65	0,35	MAGNO <i>et al.</i> (2009)
BR – Rio de Janeiro (Euro-descendentes)	51,4	34,2	14,4	0,68	0,32	ROSSINI <i>et al.</i> (2002)
BR – Rio de Janeiro (Afro-descendentes)	46,2	45,5	8,3	0,69	0,31	ROSSINI <i>et al.</i> (2002)
BR – Rio Grande do Sul (Euro-descendente)	52,2	40,0	7,8	0,72	0,28	KVITKO <i>et al.</i> (2006)
BR – Rio Grande do Sul (Afro-descendente)	29,0	58,0	13,0	0,58	0,42	KVITKO <i>et al.</i> (2006)
BR – Paraná	45,0	45,0	10,0	0,68	0,32	LEICHSENRING (2005)
BR – SC (controles)	41,8	45,2	13,0	0,64	0,36	Presente estudo

6.2 Análise de Associação

De acordo com os resultados apresentados, não houve qualquer associação entre o polimorfismo *GSTP1* A313G e as doenças estudadas. Mesmo com o aumento do número amostral, esses valores deverão ser mantidos, já que os valores de “p” se mostraram altos e os valores de OR próximos de 1.

Tanto para AR e LES, o polimorfismo *GSTP1* A313G parece não ter relação com as diferenças nas manifestações clínicas presentes nos pacientes. Matthey *et al.* (1999) também não encontraram associação do gene com a susceptibilidade a artrite reumatóide. Já Karlson *et al.* (2007) estudaram a associação entre mulheres acometidas por LES e o convívio próximo a locais tóxicos que aumentariam o risco de desenvolvimento da doença. Neste estudo não houve associação com a proximidade desses locais, porém a combinação do polimorfismo no gene *GSTP1* homozigoto variante e no gene *GSTM1*-nulo mostrou associação significativa com o diagnóstico precoce da doença. Quando comparado ao desenvolvimento de aterosclerose em AR, novamente não foram observadas associações com o polimorfismo presente neste gene (PARK *et al.*, 2004).

Os valores de OR apresentados para o uso de AC mostraram-se significativos no caso da AR, entretanto, estudos sobre a associação do anticoncepcional na AR são contraditórios. Pikwer *et al.* (2009) afirmam que não encontraram relação entre AC e o desenvolvimento da artrite reumatóide. Por outro lado, Doran *et al.* (2004) acharam resultados que mostravam uma proteção entre o uso do anticoncepcional e o desenvolvimento da artrite, corroborando os dados aqui encontrados. Por fim, Liao, Alfredsson e Karlson (2009) sugerem que a associação ou não do uso do AC ainda é dúbia e indefinida.

Apesar de não ter encontrado valor significativo para a associação entre AR e cigarro, outros estudos mostram que o hábito de fumar influencia no aumento do risco de desenvolvimento e na severidade da doença (MÁSDÓTTIR *et al.*, 2000; KLARESKOG; CATRINA; PAGET, 2009). Se houver um aumento no número amostral, tal tendência poderá ou não ser verificada. Klareskog, Catrina e Paget (2009) acrescentam que o risco do cigarro seria

mais presente naqueles pacientes de artrite que apresentam fator reumatóide positivo. De acordo com o presente estudo, este fato pode ser observado na comparação com o fator reumatóide e o tabagismo, mostrando um valor de *OR* considerável, e corroborando com a possível função do cigarro na artrite reumatóide. No caso do o LES, a associação entre tabagismo e a doença foi encontrada no presente estudo, demonstrando um papel de que o cigarro é um importante fator de risco para doenças autoimunes.

Vale ressaltar que o *GSTP1* tem fundamental importância na metabolização de fármacos, xenobióticos e espécies reativas de oxigênio. E apesar de não se mostrar, aparentemente, ligado com a susceptibilidade ao LES ou à AR, tem grande relação com o tratamento medicamentoso ao qual estas pessoas se submetem. Zhong *et al.* (2006) encontraram associação do polimorfismo A313G com o risco de mielotoxicidade no tratamento com ciclofosfamida em LES, principalmente em pacientes mais novos (menos de 30 anos) ou naqueles que tomavam uma dose maior que 1g do fármaco. Além do mais, apesar de existirem indicações da importância dessas enzimas (GSTs) no processo autoimune, o mecanismo exato em relação a esse papel ainda não se encontra muito bem esclarecido (BACK, 2007).

Por estes motivos, há a necessidade de complementação do presente estudo, observando características aqui não descritas e relacionadas (distúrbios neurológicos, acometimentos cardiovasculares, tratamento medicamentosos, etc.), e suas possíveis associações com o polimorfismo, principalmente no tratamento das doenças.

7 Conclusões

Foi criado um banco de dados com genótipos e dados epidemiológicos e clínicos para artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE). O número amostral de casos (AR e LES) e controles vem sendo ampliado.

Não foi encontrada associação entre os alelos do *SNP GSTP1* A313G e AR ou LES nesta população, nem entre o *SNP* e diferentes manifestações clínicas destas doenças.

A ausência da associação, no entanto, não exclui completamente a possibilidade do gene *GSTP1* exercer alguma influência no desenvolvimento da artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, tendo em vista que a combinação com outros diversos genes do biometabolismo pode contribuir de forma diferenciada para o desenvolvimento das doenças ou no seu tratamento medicamentoso.

Foram encontradas frequências genotípicas homogeneamente distribuídas entre pacientes e controles para o polimorfismo *GSTP1* A313G. Obtiveram-se as frequências 0,356 (controle), 0,368 (AR) e 0,386 (LES) para o alelo variante.

Para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, não houve diferenças significativas nas amostras (casos e controles), permitindo inferir que essas amostras foram obtidas de populações em equilíbrio.

Controles e casos diferem estatisticamente em relação aos seguintes hábitos: fumo (LES) e uso de anticoncepcionais (AR). Também foi observada associação entre o tabagismo e fator reumatóide positivo nas amostras de AR.

A frequência do alelo variante é semelhante às frequências encontradas na Bahia e Inglaterra, e diferente daquelas observadas em asiáticos, sul-africanos e população do Rio Grande do Sul.

Um seguimento no estudo, com acréscimo no tamanho amostral e análise de novos dados, deve ser realizado, pois o consequente aumento gerará a obtenção de resultados mais definitivos no estudo deste gene com o desenvolvimento e tratamento de doenças autoimunes.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Elsevier, 2005. 562 p.
- ADAMS, C. H. *et al.* Allele Frequencies for Glutathione S-Transferase and N-Acetyltransferase 2 Differ in African Population Groups and May Be Associated With Oesophageal Cancer or Tuberculosis Incidence. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, n. 4, p.600-605, 2003.
- ARTHRITIS FOUNDATION. **Rheumatoid Arthritis**. 2000. Traduzido pela Sociedade Brasileira de Reumatologia. Disponível em: <www.reumatologia.com.br>. Acesso em: maio 2009.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutation Research**, v. 464, p.65-76, 2000.
- BACK, L. K. C. **Lúpus eritematoso sistêmico: pesquisa de marcadores moleculares de susceptibilidade e prognóstico**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, UFSC, Florianópolis, 2007.
- BORBA, E. F. *et al.* Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 4, p.196-207, 2008.
- CHO, H. J. *et al.* *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* Polymorphisms in the Korean Population. **J Korean Med Sci**, v. 20, p.1089-1092, 2005.
- CRISWELL, L. A. The Genetic Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. **Bull Nyu Hosp Jt Dis**, v. 66, n. 3, p.176-183, 2008.
- DORAN, M. F. *et al.* The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study. **J Rheumatol**, v. 31, n. 2, p.207-213, 2004.
- EGNER, W. *et al.* The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, p.424-432, 2000.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.. Rheumatoid Arthritis. **Cell**, v. 85, p.307-310, 1996.

FIRESTEIN, G. S.. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p.356-361, 2003.

FRYER, A. A. *et al.* Polymorphism at the Glutathione S-transferase *GSTP1* Locus: A New Marker for Bronchial Hyperresponsiveness and Asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 161, p.1437-1442, 2000.

GENETICS HOME REFERENCE. **Chromosomes**. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: maio 2009.

GHOBADLOO, S. M. *et al.* *GSTP1*, *GSTM1*, and *GSTT1* Genetic Polymorphisms in Patients With Cryptogenic Liver Cirrhosis. **J Gastrointest Sug**, v. 8, p.423-442, 2004.

GOODNOW, C. C. *et al.* Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, p.590-597, 2005.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases: disorders of immune homeostasis. **Nat Rev Gen**, v. 7, p.917-928, 2006.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Glutathione S-transferase M1 (*GSTM-1*): distribuição étnica e relação com câncer. **Semina: Ci. Biol. Saúde**, Londrina, v. 22, p.3-9, 2001.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p.357-377, 2002.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 45, p.51-88, 2005.

HEALTH Decision Strategies EpiMax Table Calculator Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: novembro 2009.

HEWAGAMA, A.; RICHARDSON, B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **Journal Of Autoimmunity**, v. 33, n. 1, p.3-11, 2009.

INVERNIZZI, P.; GERSHWIN, M. E. The genetics of human autoimmune disease. **J Autoimmun**, v. 33, p.290-299, 2009.

JANEWAY, C. *et al.* **Imunobiologia**. 5. ed. New York: Garland Science, 2002. 800 p. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Books>>. Acesso em: novembro 2009.

JOHANSSON, A. S. *et al.* Structure – Activity Relationships and Thermal Stability of Human Glutathione Transferase P1-1 Governed by the H-site Residue 105. **J. Mol. Biol**, v. 278, p.687-698, 1998.

KARLSON, E. W. *et al.* Effect of Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Proximity to Hazardous Waste Sites on Time to Systemic Lupus Erythematosus Diagnosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 1, p.244-254, 2007.

KLARESKOG, L.; CATRINA, A. I.; PAGET, S. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 373, p.659-672, 2009.

KOTZIN, B. L. Systemic Lupus Erythematosus. **Cell**, v. 85, p.303-306, 1996.

KVITKO, K. *et al.* *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in an Afro-Brazilian group. **Genetics And Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p.613-616, 2006.

LECOMTE, T. *et al.* Glutathione S-Transferase P1 Polymorphism (Ile105Val) Predicts Cumulative Neuropathy in Patients Receiving Oxaliplatin-Based Chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 10, p.3050-3056, 2006.

LEICHSENDRING, A.. **INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES CYP1A1 E GSTP1 EM PORTADORES DE TUMORES DE CAVIDADE BUCAL**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética, UFPR, Curitiba, 2005.

LIAO, K. P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. W.. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, p.279-283, 2009.

LYNN, A. H. *et al.* Genetic Epidemiology of Rheumatoid Arthritis. **Am. J. Hum. Genet**, v. 57, p.150-159, 1995.

MAGNO, L. A. V. *et al.* Glutathione S-Transferase Variants in a Brazilian Population. **Pharmacology**, v. 83, p.231-236, 2009.

MÁSDÓTTIR, B. *et al.* Smoking, rheumatoid factors isotypes and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 39, p.1202-1205, 2000.

MATTEY, D. L. *et al.* Association of polymorphism in glutathione S-transferase loci with susceptibility and outcome in rheumatoid arthritis: comparison with the shared epitope. **Ann Rheum Dis**, v. 58, p.164-168, 1999.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer: The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutation Research**, v. 544, p.9-41, 2003.

MOSCOW, J. A. *et al.* Isolation of the human anionic glutathione S-transferase cDNA and the relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. **Proc. Natd. Acad. Sci**, v. 85, p.6518-6522, 1988.

MOSER, K. L. *et al.* Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes And Immunity**, v. 10, p.373-379, 2009.

NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: maio 2009.

OLIVER, J. E.; WORTHINGTON, J.; SILMAN, A. J. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 18, p.141-146, 2006.

PANDYA, U. *et al.* Activity of Allelic Variants of Pi Class Human Glutathione S-Transferase Toward Chlorambucil. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 278, p.258-262, 2000.

PARK, J. H. *et al.* Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 gene polymorphisms and carotid atherosclerosis in Korean patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 24, p.157-163, 2004.

PARRAS, F. C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. **PNAS**, v. 100, n. 1, p.177-182, 2003.

PIKWER, M. *et al.* Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 68, p.526-530, 2009.

RADU, A. S. Artrite Reumatóide: entendendo a doença, seus aspectos e consequências. **Revista Racine**, São Paulo, n. 93, p.8-18, ago. 2006.

ROSSINI, A. *et al.* Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 1, p.233-240, 2002.

SAMBROOK; RUSSEL, **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3ª Edição, 2001.

SATO, I. E. *et al.* Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 42, n. 6, p.362-370, 2002.

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. **J Hum Genet**, v. 47, p.561-566, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA – SBR. **Principais Doenças e Orientações ao Paciente**. Disponível em <http://www.reumatologia.com.br/>. Acesso em novembro de 2009.

VETTRISELVI, V. *et al.* Genetic variation of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* genes in a South Indian population. **Asian Pac. J. Cancer Prev**, v. 7, n. 2, p.325-328, 2009.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann Hum Genet**, v. 19, n. 4, p.251-253, 1955.

ZHONG, S. *et al.* Relationship of glutathione S-transferase genotypes with side-effects of pulsed cyclophosphamide therapy in patients with systemic lupus erythematosus: A New Marker for Bronchial Hyperresponsiveness and Asthma. **Br J Clin Pharmacol**, v. 62, n. 4, p.457-472, 2006.

Anexo A



Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB
Departamento de Clínica Médica/CCS
Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Artrite Reumatóide

NOME: _____ **PRONTuário/HU:** _____
IDADE: _____ anos **SEXO:** () F () M **COR da Pele:** _____
Procedência: _____ **Natural de:** _____
Estado Civil: () S () C () D () V **Ocupação:** _____
Telefone: _____
DATA: ____/____/____ **AR:** _____

Médico: _____
Responsável: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____
CIDADE onde nasceu: _____ **Profissão:** _____
DESCEndência: Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____
CIDADE onde nasceu: _____ **Profissão:** _____
DESCEndência: Materna _____ Paterna _____

Tempo de doença diagnosticada: _____

Histórico Familiar: AR: () S () N Parentesco: _____
Outras D. Reumat.: () S () N Parentesco: _____

Manifestações Iniciais: () Febre () Rigidez Matinal
() Derrame Articular () Dor Articular

Articulações Acometidas:

() Ombro () Cotovelo () Punho () MCF
() IFPM () Quadril () Joelho () Tornozelo
() MTF () IFPP Total: _____ articulações

Manifestações Extra-articulares:

() Pleurite () Pericardite
() Vasculite Reumatóide () Nódulos Reumatóides
() Acometimento Ocular () Acometimento Pulmonar
() Acometimento Renal () Amiloidose
() Sjögren Secundário () Outras
Quais? _____

Evolução: Internações: () S () N Quantas? _____ Motivos? _____

Observações: Osteoporose? Diabetes? Depressão? _____

Sintomatologia Recente: ☐ Febre ☐ Rigidez Matinal
(Nos últimos 10 dias) ☐ Derrame Articular ☐ Dor Articular

Articulações Acometidas:

☐ Ombro ☐ Cotovelo ☐ Punho ☐ MCF
☐ IFPM ☐ Quadril ☐ Joelho ☐ Tornozelo
☐ MTF ☐ IFPP Total: _____ articulações

Manifestações Extra-articulares:

☐ Pleurite ☐ Pericardite
☐ Vasculite Reumatóide ☐ Nódulos Reumatóides
☐ Acometimento Ocular ☐ Acometimento Pulmonar
☐ Acometimento Renal ☐ Amiloidose
☐ Sjögren Secundário
☐ Outras Quais? _____

Envolvimento Cardiovascular: ☐ HAS ☐ Doença Coronariana
☐ Angina ☐ IAM Prévio
☐ Revascularização do Miocárdio
☐ Cateterismo Prévio

Envolvimento Neurológico: ☐ AVC ☐ AIT ☐ Ateroma em Carótidas

Dislipidemia: ☐ Hipercolesterolemia ☐ Hipertrigliceridemia

Hist. Familiar de Doença Cardiovascular: ☐ S ☐ N

Parentesco: _____

DAS 28 =

Health Assesment Questionnaire (HAQ)

Você é capaz de:	Nível de Dificuldade			
	Sem Qualquer	Com alguma	Com muita	Incapaz de fazer
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões do sapato e abotoar suas roupas?	0	1	2	3
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos?	0	1	2	3
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braço?	0	1	2	3
4. Deitar-se e levantar-se da cama?	0	1	2	3
5. Cortar um pedaço de carne?	0	1	2	3
6. Levar à boca um copo ou uma xícara cheia de café ou água?	0	1	2	3
7. Abrir um saco de leite comum?	0	1	2	3
8. Caminhar em lugares planos?	0	1	2	3
9. Subir 5 degraus?	0	1	2	3
10. Lavar e secar seu corpo após o banho?	0	1	2	3
11. Tomar banho de chuveiro?	0	1	2	3
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário?	0	1	2	3
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 kg que está posicionado pouco acima de sua cabeça?	0	1	2	3
14. Curvar-se para pegar suas roupas no chão?	0	1	2	3
15. Segurar-se em pé no ônibus ou no metrô?	0	1	2	3
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido abertos previamente?	0	1	2	3
17. Abrir e fechar torneiras?	0	1	2	3
18. Fazer compras nas redondezas onde mora?	0	1	2	3
19. Entrar e sair de um ônibus?	0	1	2	3
20. Realizar tarefas tais como usar a vassoura para varrer e rodo para água?	0	1	2	3

Escore dos Componentes:

Componente 1, perguntas 1 e 2: _____	Maior escore: _____
Componente 2, perguntas 3 e 4: _____	Maior escore: _____
Componente 3, perguntas 5, 6 e 7: _____	Maior escore: _____
Componente 4, perguntas 8 e 9: _____	Maior escore: _____
Componente 5, perguntas 10, 11 e 12: _____	Maior escore: _____
Componente 6, perguntas 13 e 14: _____	Maior escore: _____
Componente 7, perguntas 15 e 16: _____	Maior escore: _____

Componente 8, perguntas 18, 19 e 20: _____ Maior escore: _____

Média Aritmética dos
Escore dos Componentes = _____

Escore do HAQ: _____

.....
Tratamento Atual: CORTICosteróides: ()S ()N Qual? _____
Dose? _____ Freqüência? _____

METOtrexato: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

SULFASSALazina: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

ANTIMALárico: ()S ()N Qual? _____
Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOFosfamida: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

INFLIXImab: ()S ()N Ampolas? _____ Freqüência? _____

ETANERcept: ()S ()N Ampolas? _____ Freqüência? _____

AINE: ()S ()N Qual? _____
Dose? _____ Freqüência? _____

ANALGésicos: ()S ()N Qual? _____
Dose? _____ Freqüência? _____

Outros: ()S ()N Quais? _____
Dose? _____ Freqüência? _____

.....
Idade da MENARCA: _____ anos **MENOPAUSA:** ()S ()N Idade: _____ anos

GESTA: _____ **PARA:** _____ **FASE do Ciclo Reprodutivo:** ()Menacme
()Climatério

Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico: ()S ()N Qual? ()AC ()Outro

Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico: ()S ()N
Quais? _____

.....
História de Uso de DROGAS: Álcool: ()S ()N

Tipo: _____
Qtde? _____ Freqüência? _____

Cigarro: ()S ()N Cigarros/dia: _____
Se fumava, qual a duração? _____

Quando parou? _____

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual? _____
Por quanto tempo? _____

Anexo B



Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB
Departamento de Clínica Médica/CCS
Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

NOME: _____ PRONTuário/HU: _____
IDADE: _____ anos SEXO: ()F ()M COR da Pele: _____
PROCedência: _____ NATural de: _____
ESTado CIVil: ()S ()C ()D ()V OCUPação: _____
TELEfone: _____
Data: _____ LUP _____

Médico: _____

DADOS Familiares:

NOME do pai: _____

CIDAdE onde nasceu: _____ Profissão: _____
DESCENDência: Materna _____ Paterna _____

NOME da mãe: _____

CIDAdE onde nasceu: _____ Profissão: _____
DESCENDência: Materna _____ Paterna _____

TEMPO de doença diagnosticada:

HISTória FAMiliar: Lúpus: ()S ()N Parentesco: _____
Outras D. Reumat.: ()S ()N Parentesco: _____

MANIFestações INICiais: () Febre () Alopecia

() Fenômeno de Raynaud () Rash Malar
() Rash Discóide () Fadiga
() Artrite () Fotossensibilidade
() Úlcera oral ou nasal () Serosite
() Distúrbio Renal () Distúrbio Neurológico
() Distúrbio Hematológico () Hipertensão Arterial
() Vasculite
() Outras? Quais? _____

Evolução: INTERNAções: ()S ()N Quantas? _____ Motivos? _____

MANIFestações ASSOCIadas: ()S ()N Quais? _____

SOBREPosição com alguma ()Esclerodermia

outra doença reumatológica: ()Sjögren

()Dermatomiosite

()SAF

()Fibromialgia

()Outras Quais? _____

OBServações: diabetes? Depressão?

SINTomatologia RECente: ()Febre ()Alopecia
(**últimos 10 dias**) ()Fenômeno de Raynaud ()*Rash* Malar

()*Rash* Discóide

()Fadiga

()Artrite

()Fotossensibilidade

()Úlcera oral ou nasal

()Serosite

()Distúrbio Renal

()Distúrbio Neurológico

()Distúrbio Hematológico

()Hipertensão Arterial

()Vasculite

()Outras? Quais? _____

Tratamento Atual: CORTICosteróides: ()S ()N

Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

AZATioprina: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

ANTIMALárico: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

METOtrexato: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOSPorina: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

CICLOFosfamida: ()S ()N Dose? _____ Freqüência? _____

AINE: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

ANALGésicos: ()S ()N Qual? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

Outros: ()S ()N Quais? _____

Dose? _____ Freqüência? _____

Idade da MENARCA: _____ anos **MENOPAUSA:** ()S ()N Idade: _____ anos

GESTA: _____ **PARA:** _____ **FASE do Ciclo Reprodutivo:** ()Menacme
()Climatério

Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico: ()S ()N Qual? ()AC ()Outro

Duração: _____ Parou há quanto tempo? _____

Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico: ()S ()N
Quais? _____

.....
História de Uso de DROGAS: Álcool: ()S ()N

Tipo? _____

Qtde? _____ Frequência? _____

Cigarro: ()S ()N Cigarros/dia: _____

Se fumava, qual a duração? _____

Quando parou? _____

Drogas Ilícitas: ()S ()N Qual? _____

Por quanto tempo? _____

SLEDAI

(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

Modificação SELENA

Avaliação Global do Médico _____

0 1 2 3

Nula Leve Média Severa

Score SLEDAI

Marque se o descriptor estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores.

Pes	Pres.	Descriptor	Definição
8	()	Convulsão	Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica.
8	()	Psicose	Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas.
8	()	Síndrome Cerebral Orgânica	Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas.
8	()	Distúrbio Visual	Alterações retinianas do lúpus.. Inclui corpos citóides, hemorragias retinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas.
8	()	Distúrbio em Nervo Craniano	Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	()	Cefaléia do Lúpus	Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica.
8	()	AVC	Início recente de AVC. Excluir aterosclerose
8	()	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou angiograma provando vasculite.
4	()	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, derrame articular ou sensibilidade)
4	()	Miosite	Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite.
4	()	Cilindros Urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granulares.

4	()	Hematuria	>5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa.
4	()	Proteinúria	>0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h.
4	()	Piúria	>5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	()	<i>Rash</i> Novo	Início recente ou recorrência de <i>rash</i> do tipo inflamatório.
2	()	Alopécia	Início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa.
2	()	Úlceras em Mucosas	Início recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais.
2	()	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou espessamento pleural.
2	()	Pericardite	Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica.
2	()	Complemento Baixo	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório.
2	()	Agregação de DNA Aumentada	>25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório
1	()	Febre	>38°C. Excluir causas infecciosas.
1	()	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm ³ .
1	()	Leucopenia	<3000 leucócitos/mm ³ . Excluir causas farmacológicas

_____ Score Total (soma dos pesos)

Crise Leve ou Moderada ()	Severa ()
() Mudança no SLEDAI >3 pontos	() Mudança no SLEDAI >12 pontos
() Úlceras nasofaríngeas	() SNC-LES recente ou pior
Pleurite	Vasculite (???)
Pericrdite	Nefrite
Artrite	Miosite
Febre (LES)	Pk<60.000
Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior	Hb<7% ou diminuição na HB>3%
() Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	Precisando de prednisona em dobro
() Adicionado AINE ou Plaquenil	() Prednisona>0,5 mg/kg/dia
() Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	() Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES
	() Aumento no PGA para mais de 2,5

Anexo C

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG

QUESTIONÁRIO – Grupo Controle

Data: __/__/__ Coleta: () sangue

Entrevistador: _____

Dados Pessoais:

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Telefone: _____ Celular: _____

Profissão: _____ Escolaridade: _____

Idade: _____ Sexo: () M () F Tipo de sangue: _____

Peso: _____ Altura: _____ Estado Civil: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____

Raça e cor: () Branco () Negróide () Asiático () Indígena

Observações: _____

Dados dos Pais:

Nome do pai: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Nome da mãe: _____

Naturalidade: _____ Ascendência: _____ Profissão: _____

Possui Irmãos: () Sim () Não Quantos: _____

Hábitos:

Come FRUTAS regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Come VERDURAS e LEGUMES regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Come CARNE regularmente? () Sim () Não

Tipo: _____

Frequência: _____ Que tipo nunca come? _____

Ingere BEBIDA ALCOÓLICA? () Sim () Não
Frequência: () Todos os dias () Fim de semana () Esporadicamente
Quantidade: _____
Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?
() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____
Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?
() Cerveja () Vinho () Cachaça () Outro _____

Pratica EXERCÍCIOS FÍSICOS? () Sim () Não
Tipo: _____
Frequência: _____
FUMA? () Sim () Não FUMOU? () Sim () Não
Tipo: () Cigarro () Charuto () Cachimbo () Outro _____
Quantidade e Frequência: _____
Tempo que fuma ou fumou: _____
Há quanto tempo parou: _____

Histórico Hormonal e Reprodutivo

Idade da MENARCA: _____ MENOPAUSA: () Sim () Não
Idade: _____
PARIDADE: () nulípara () 1 () 2 () >2 _____ Idade da 1ª
Gestação _____
Amamentou: () Sim () Não Tempo total: _____ Abortos: () P _____ () E _____
Trat. Hormonal: () AC Tempo total: _____ () Outros Tempo total: _____

Histórico Médico

Casos de **CÂNCER** na família? () Sim () Não
Grau de Parentesco: _____
Tipo: _____
Casos de TUMOR BENIGNO? () Sim () Não
Local: _____
Grau de Parentesco: _____
Tem ou teve alguma outra doença grave? _____
Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? () Sim () Não
Tipo: _____ Tempo que utilizou: _____

Casos de **Doença Auto-imune** na família? () Sim () Não
Grau de Parentesco: _____
Tipo: _____

Observações: _____

Anexo D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram artrite reumatóide e controles saudáveis. Para isto pedimos a colaboração para doar 10 ml de sangue periférico (com anticoagulante EDTA) e para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. O questionário e a coleta de material serão feitas por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinados para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações aqui coletadas, bem como dos resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. Caso o paciente não queira mais participar da pesquisa, poderá reaver sua amostra de DNA.

Toda a equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721-9804.

Anexo E



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram lúpus e controles saudáveis. Para isto pedimos a colaboração para doar 10 ml de sangue periférico (com anticoagulante EDTA) e para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. O questionário e a coleta de material serão feitas por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinados para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações aqui coletadas, bem como dos resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. Caso o paciente não queira mais participar da pesquisa, poderá reaver sua amostra de DNA.

Toda a equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721-9804.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu declaro que concordo em participar da pesquisa “**Genética da Auto-imunidade**” na condição de voluntário de acordo com os critérios expostos no termo de consentimento livre e esclarecido:

Florianópolis,

Assinatura: _____

RG: _____